



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **O ÓXIDO NÍTRICO E A DOENÇA PERIODONTAL**

Trabalho submetido por  
**Mariana Mendes Perestrelo Guanilho**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2017**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **O ÓXIDO NÍTRICO E A DOENÇA PERIODONTAL**

Trabalho submetido por  
**Mariana Mendes Perestrelo Guanilho**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida**

**outubro de 2017**



### *Dedicatória*

*Aos meus pais,  
por se esforçarem constantemente para que  
eu seja uma pessoa mais completa e feliz.*



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida, pelo apoio na realização desta monografia e por me ter dado a conhecer um tema que desconhecia e pelo qual desenvolvi interesse.

Ao corpo docente do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, pela dedicação e vontade de transmitir aos alunos os melhores conhecimentos, com rigor e excelência. A toda a equipa de funcionários presente na faculdade, por nos proporcionarem um ambiente relaxado e de convívio, que tanta falta faz durante o decorrer de um curso.

Aos meus amigos, que foram uma presença constante durante o meu percurso académico; à Nádia, à Sofia e ao Pedro, por serem os melhores companheiros para a vida. Especialmente, agradeço à Mariana, minha colega de box, que diariamente partilhou comigo angústias e alegrias, o que permitiu aliviar a carga emocional deste processo.

Ao João, por nunca duvidar das minhas capacidades, por ser uma presença assídua em todas as vertentes da minha vida e por me convencer sempre de que eu seria capaz, ao longo de todo o curso. Obrigada por todas as palavras, amor e carinho.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família, que não duvidou de mim por um segundo. Particularmente, agradeço aos meus enormes pais, Luís e Dulce, que são a causa deste meu percurso. Sem eles, não teria sido possível a concretização deste curso. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, por acreditarem e confiarem cegamente em mim e por terem seguido ao meu lado durante toda esta viagem, com o carinho e preocupação que vos é característico.

Obrigada a todos!





## RESUMO

A doença periodontal é uma das doenças do corpo humano com maior prevalência a nível mundial e que, por apenas desenvolver sinais num estado mais avançado, é considerada uma doença silenciosa. Dadas estas características, urge a necessidade de entender e definir com clareza os intervenientes no desenvolvimento desta patologia. O óxido nítrico é uma molécula que tem sido fortemente associada ao processo fisiopatológico da doença periodontal e, por esse motivo, esta monografia centra-se na compreensão dos mecanismos através dos quais esta molécula interfere no desenvolvimento da doença.

Apesar de já se terem publicados vários trabalhos nesta temática, os mecanismos pelos quais o óxido nítrico modula o progresso da doença periodontal e as condições em que este se torna patológico ainda não estão claramente identificados e esclarecidos. Como tal, é necessário aprofundar e realizar novos estudos com a perspectiva de se conseguir, no futuro, implementar correcta e atempadamente medidas terapêuticas de combate à doença. Por outro lado, importa investigar com clareza, a presença (ou não) do óxido nítrico na doença periodontal, de modo a comprovar a hipótese de este ser um biomarcador da mesma. Se se confirmar a associação do óxido nítrico à doença periodontal, o desenvolvimento e aplicação de um teste rápido para detecção desta molécula poderia facilitar o diagnóstico da doença periodontal e assim, evitar uma progressão irreversível da mesma.

**Palavras-chave:** Óxido Nítrico; Doença Periodontal; NOS; Peroxinitrito.



## **ABSTRACT**

The periodontal disease is one of the most prevalent diseases of the human body worldwide, being considered a silent disease that develops signs at a late stage only. As so, there is an urgent need to better understanding the molecular mechanisms underlying the disease onset and development. Nitric oxide is a molecule that has been strongly associated to the patophysiological process of the periodontal disease. Therefore, the aim of this monography is to describe the current state-of-the-art regarding the mechanisms involving nitric oxide with/on the periodontal disease.

Despite many studies have been already published, the mechanisms by which nitric oxide modulates the progression of periodontal disease and the conditions in which it becomes pathological have not yet been clearly understood. Thus, new studies on this topic should be performed in order to properly implement new therapies against the disease. In addition, one should investigate the correlation between nitric oxide and periodontal disease to prove its potential role as biomarker. In such a case, the development of a point-of-care tests for nitric oxide would be very helpful for the periodontal disease diagnosis, thereby avoiding its irreversible progression.

**Key-words:** Nitric Oxide; Periodontal Disease; NOS; Peroxynitrite.



## ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO .....	15
II.	DESENVOLVIMENTO .....	17
1.	DOENÇA PERIODONTAL .....	17
1.1.	Anatomia do Periodonto.....	17
1.2.	Classificação da Doença Periodontal .....	20
1.3.	Mecanismos da Doença Periodontal .....	22
2.	ÓXIDO NÍTRICO .....	25
2.1.	Características do Óxido Nítrico .....	25
2.2.	Biossíntese do NO .....	26
2.2.1.	Via L-Arginase – NO .....	26
2.2.2.	Via Nitrato – Nitrito – Óxido Nítrico.....	27
2.3.	Sintases do Óxido Nítrico - NOS .....	29
3.	ÓXIDO NÍTRICO E DOENÇA PERIODONTAL .....	34
3.1.	Formação de Agentes Oxidantes.....	35
3.2.	Citotoxicidade do peroxinitrito .....	36
3.3.	Modificação de proteínas – Nitração da tirosina.....	36
3.4.	Peroxidação lipídica .....	37
3.5.	Produção de metaloproteinases da matriz .....	38
3.6.	Danos no ADN .....	39
3.7.	Reabsorção Óssea.....	41
4.	MEDIÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO .....	44
4.1.	Medição de produtos do NO .....	44
4.2.	Medição de iNOS .....	48
III.	CONCLUSÃO.....	49
IV.	BIBLIOGRAFIA .....	51



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Composição da gengiva e área de contacto entre esta e o esmalte (Adaptado de Lindhe et al., 2003).....	18
<b>Figura 2.</b> Medição com sonda periodontal de sulco gengival em gengiva saudável (Adaptado de Lindhe et al., 2003) .....	18
<b>Figura 3.</b> Orientação das fibras do ligamento periodontal (Adaptado de Lindhe et al., 2003). .....	19
<b>Figura 4.</b> Corte seccional do osso alveolar da maxila que suporta as raízes dentárias (indicadas pelas setas) (Adaptado de Lindhe et al., 2003) .....	20
<b>Figura 5.</b> Medição de bolsa periodontal com sonda periodontal graduada. (Adaptado de Nyman & Lindhe, 2003).....	21
<b>Figura 6.</b> Várias fases da doença periodontal (Traduzido e adaptado de Kinane et al., 2017) .....	22
<b>Figura 7.</b> Imagem da arcada inferior de paciente periodontal antes (A) e após (B) destartarização (Adaptado de Nyman & Lindhe, 2003) .....	23
<b>Figura 8.</b> Formação de Óxido Nítrico a partir de L-arginina, numa reacção catalisada pela NOS (Adaptado de Dusse et al., 2003) .....	26
<b>Figura 9.</b> Ciclo do nitrato – nitrito – NO (Adaptado e traduzido de Lundberg et al., 2009).....	28
<b>Figura 10.</b> Estrutura molecular da enzima NOS. (Traduzida e adaptada de Lorin et al., 2013) .....	29
<b>Figura 11.</b> Isoformas da NOS (Adaptado de Dusse et al., 2003).....	30
<b>Figura 12.</b> NOS e as suas funções (Traduzido e adaptado de Förstermann & Sessa, 2012) .....	33
<b>Figura 13.</b> Estímulo da produção de prostaglandinas através da activação da COX-2 pelo NO (Traduzido e adaptado de Needleman & Manning, 1999) .....	42
<b>Figura 14.</b> O peroxinitrito é sintetizado através da reacção entre o óxido nítrico e o superóxido e activa a COX-2, que sintetiza PGE2 a partir do araquidonato (Traduzido e adaptado de Landino et al., 1996) .....	43





## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características de estudos que comparam os níveis de NO na doença periodontal.....	47
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

**8-oxo-dG** – 8-Hidroxidesoxiguanosina

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**BH<sub>4</sub>** – Tetrahidrobiopterina

**CaM** – Calmodulina

**COX-2** – Cicloxigenase-2

**DesoxiHb** – Desoxihemoglobina

**eNOS** – Sintase do Óxido Nítrico Endotelial, do inglês *Endothelium Nitric Oxide Synthase*

**FAD** - Dinucleótido de Flavina e Adenina, do inglês *Flavin Adenine Dinucleotide*

**FMN** – Mononucleótido de Flavina, do inglês *Flavin Mononucleotide*

**cGMP** – Monofosfato de Guanosina Cíclico, do inglês *Cyclic Guanosine Monophosphate*

**GSNO** – S-nitrosoglutathione

**HbFe<sup>3+</sup>** – Metahemoglobina

**HbFe<sup>3+</sup>-NO** – Hemoglobina Nitrosil Ferrosa

**iNOS** – Sintase do Óxido Nítrico Induzida, do inglês *Induced Nitric Oxide Synthase*

**L-arg** – L-Arginina

**L-NA** – NG-nitro-L-arginina

**L-NAA** – NG-amino-L-arginina

**L-Name** – NG-nitro-L-arginina-metil-éster

**L-NIO** – N-imino-etil-L-ornitina

**L-NMMA** – NG-monometil-L-arginina

**LOO•** – Radical Peroxil Lipídico

**LOOH** – Hidroperóxido Lipídico

**MDA** – Malondealdeído

**MMP** – Metaloproteinase da Matriz, do inglês *Matrix Metalloproteinase*

**NAD<sup>+</sup>** – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Oxidado, do inglês *Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

**NADPH** –Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Reduzido, do inglês *Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

**NFκB** – Factor Nuclear κB, do inglês *Nuclear Factor κB*

**nNOS** – Sintase do Óxido Nítrico Neuronal, do inglês *Neuronal Nitric Oxide Synthase*

**NOS** – Sintase do Óxido Nítrico, do inglês *Nitric Oxide Synthase*

**OxiHb** – Oxihemoglobina

**PARP** – Poli(ADP-ribose) Polimerase

**PGE2** – Prostaglandina E2

**PMN** – Neutrófilo Polimorfonuclear, do inglês *Polimorphonuclear Neutrophil*

**RANK** – Ativador do Receptor do Factor Nuclear κB, do inglês *Receptor Activator of Nuclear Factor κB*

**RANKL** – Ativador do Receptor do Ligando do Factor Nuclear κB, do inglês *Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand*

**RNS** – Espécie Reactiva do Azoto, do inglês *Reactive Nitrogen Specie*

**ROS** – Espécie Reactiva do Oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Specie*

**SOD** – Dismutase do Superóxido, do inglês *Superoxide Dismutase*

**TIMP** – Tecido Inibidor de Metaloproteinases



## I. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença progressiva e inflamatória associada à destruição dos tecidos que suportam os dentes na cavidade oral, denominados por periodonto (Nanci & Bosshardt, 2006; Antonini, Cancellier, Ferreira, Scaini & Streck, 2013).

Esta doença afecta mais de 50% da população com idade superior a 50 anos e inicia-se com a presença de placa bacteriana junto à margem gengival. Existem duas formas de expressão da doença periodontal: a gengivite e a periodontite. A presença de bactérias desencadeia um processo inflamatório na gengiva, e, nesta fase, a doença é denominada por gengivite. Quando a presença de placa bacteriana não é eliminada, a doença progride e a inflamação atinge não só a gengiva como o resto dos tecidos que circundam o dente, levando à destruição destes tecidos e à perda de inserção do dente nos mesmos. Nesta fase, quando existe destruição tecidular, a doença é designada por periodontite (Antonini et al., 2013; Larsen & Fiehn, 2017; Kinane, Stathopoulou & Papapanou, 2017). Actualmente, distinguem-se duas formas de periodontite: crónica e agressiva. A primeira decorre de modo lento, enquanto a segunda tem uma evolução rápida (Antonini et al., 2013).

Esta patologia, apesar de ser despoletada apenas quando existe placa bacteriana, é multifactorial e relaciona-se também com a qualidade imunitária do hospedeiro. Numa fase inicial, ocorre uma inflamação em resposta à presença de bactérias, apesar de esta ser totalmente reversível. Caso não se remova o estímulo bacteriano, a resposta imunitária é excessiva, a inflamação persiste e existe perturbação da homeostase, o que promove a evolução e agravamento da doença (Cekici, Kantarci, Hasturk & Van Dyke, 2014).

A doença periodontal não provoca dor quando é iniciada e pode nem vir a provocar dor numa fase mais avançada, uma vez que as vias de sinalização nervosa estão desreguladas. Por este motivo, o hospedeiro provavelmente não se aperceberá da sua condição a menos que faça visitas regulares ao médico dentista que, clinicamente e após breve análise, pode identificar a presença da doença. Visto que é uma das patologias com maior prevalência a nível mundial, seria importante compreender claramente os mecanismos adjacentes ao início e propagação da doença, bem como existir um método de diagnóstico de uso fácil e prático que permitisse identificar precocemente biomarcadores da doença periodontal, de modo a evitar a progressão da

inflamação tecidular até uma fase irreversível (Kim, Kim & Camargo, 2013; Hasturk & Kantarci, 2015).

O óxido nítrico (NO) está associado ao desenvolvimento da doença periodontal, pois a sua concentração aumenta devido ao processo inflamatório que decorre durante a evolução da patologia. Se por um lado, o óxido nítrico tem uma função de defesa contra os microrganismos periodontais, por outro lado, tem também um papel na destruição dos tecidos quando em quantidades excessivas, levando a um descontrolo e aumento da gravidade da doença (Borkar, Buthada & Pandagale, 2016).

O óxido nítrico é uma molécula com múltiplas funções de extrema importância no corpo humano, onde se encontra em pequenas concentrações. Além da actividade citotóxica contra bactérias, fungos e organismos protozoários (Borkar et al., 2016), tem a capacidade de fornecer imunidade ao hospedeiro, e desempenha um papel como mediador em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (Sundar, Krishnan, Krishnaraj, Hemalatha & Alam, 2013). Entre os fisiopatológicos destaca-se, nesta monografia, a já referida resposta destrutiva do óxido nítrico em relação à placa bacteriana que acaba por levar, directa ou indirectamente, à osteoclasia do osso que circunda o dente (Herrera et al., 2011).

Por ser uma molécula altamente reactiva na presença de oxigénio, a medição directa de óxido nítrico nos fluídos humanos está dificultada. O nitrito e o nitrato são produtos finais da oxidação do óxido nítrico e são, claramente, mais estáveis do que este. Como tal, podem ser utilizados como indicadores da presença do óxido nítrico, tornando esta molécula um biomarcador indirecto da doença periodontal. Refira-se que definir biomarcadores de uma doença permite não só identificá-la precocemente como, também, agir de maneira mais precisa contra a sua progressão (Topcu et al., 2014).



## I. DESENVOLVIMENTO

### 1. DOENÇA PERIODONTAL

---

#### 1.1. Anatomia do Periodonto

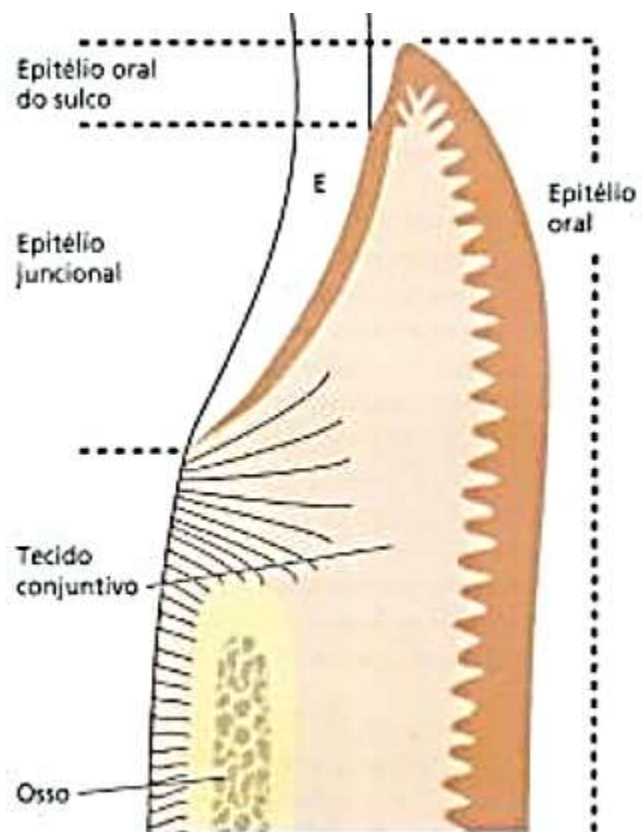
O periodonto é definido pelo conjunto de tecidos presentes na cavidade oral que oferecem suporte aos dentes, permitindo-lhes manter a sua posição e função. Esses tecidos são a gengiva (ou junção dentogengival), o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar (Nanci & Bosshardt, 2006).

- Gengiva – Junção dentogengival

A junção dentogengival é compreendida como a porção de gengiva que se encontra virada para o dente, constitui a mucosa oral mastigatória, e é formada por tecido epitelial e por uma camada de tecido conjuntivo abaixo desta (Lindhe, Karring & Araújo, 2003; Nanci & Bosshardt, 2006).

O epitélio juncional é constituído por epitélio escamoso estratificado e abraça a porção cervical do dente. O tecido conjuntivo suporta o epitélio juncional e é bastante vascularizado. A alta vascularização do tecido conjuntivo explica o facto de existir no local, mesmo em condições de saúde, um infiltrado de células inflamatórias como neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e linfócitos T. Estas células, bem como os monócitos característicos do tecido conjuntivo, vão passando para o epitélio juncional e ocupam os seus espaços intercelulares. Após a sua passagem para o epitélio juncional, os PMNs e monócitos passam para o sulco gengival e, aí, actuam na defesa contra a população microbiana. Assim, o epitélio representa uma barreira entre a cavidade oral e o resto dos tecidos periodontais, sendo considerado a primeira linha de defesa física contra os organismos patogénicos (Nanci & Bosshardt, 2006).

A gengiva apresenta duas porções: a sua porção livre, denominada gengiva livre, e a sua porção aderida, que se continua com a mucosa alveolar (Lindhe et al., 2003).



**Figura 1.** Composição da gengiva e área de contacto entre esta e o esmalte (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

Numa condição de saúde, existe um espaço de pequenas dimensões, denominado sulco gengival, entre a margem da gengiva livre e o dente, que pode ser medido através de sonda periodontal (Lindhe et al., 2003).



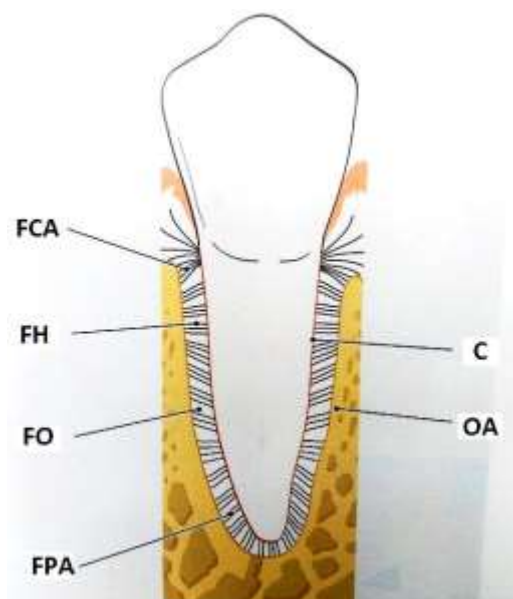
**Figura 2.** Medição com sonda periodontal de sulco gengival em gengiva saudável (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

- Cimento:

O cimento é um tipo de tecido conjuntivo que se encontra na superfície da raiz do dente e tem como principal função a ligação às fibras do ligamento periodontal. Classifica-se em dois tipos, diferenciados pela ausência ou presença de células: cimento acelular e cimento celular. O primeiro tipo, acelular, representa uma importante fonte de suporte periodontal por ter em si inseridas as principais fibras do ligamento periodontal, conhecidas como fibras de Sharpey. O segundo tipo, celular, está principalmente presente no terço apical ou na metade apical da raiz, bem como nos locais de furca da raiz, apesar de se poder encontrar também ao longo de toda a raiz, devido à sua função. Como tem na sua constituição cimentoblastos, que produzem colagénio, e cimentócitos, retidos na matriz formada pelo colagénio, o cimento celular é considerado um reparador de tecidos por ter capacidade de preencher pequenas falhas na raiz (Lindhe et al., 2003; Nanci & Bosshardt, 2006).

- Ligamento periodontal:

O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo especializado e altamente vascularizado que faz a ligação entre o cimento e a parede óssea alveolar (Lindhe et al., 2003). Tem como função primordial o suporte do dente no seu espaço no osso alveolar e actua como receptor sensorial, permitindo perceber qual é a correcta posição da mandíbula durante a mastigação. Para além disso, reserva células que permitem a reparação ou regeneração tecidular (Nanci & Bosshardt, 2006). As fibras do ligamento periodontal têm diferentes disposições e organizam-se espacialmente da seguinte forma:



**Figura 3.** Orientação das fibras do ligamento periodontal (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

FCA = fibras da crista alveolar;

FH = fibras horizontais;

FO = fibras horizontais;

FPA = fibras de posição apical;

C = cimento;

OA = osso alveolar

- Osso alveolar:

O processo alveolar é o local no osso maxilar e mandibular onde estão presentes espaços onde se alojam as raízes dentárias, chamados alvéolos. O osso da maxila e da mandíbula é constituído por corticais de osso compacto, um centro esponjoso e osso alveolar, que circunda o alvéolo. O osso alveolar, importante no suporte do dente, é constituído por várias fibras intrínsecas e apresenta, quase perpendiculares à sua superfície, as fibras de Sharpey, que são a extremidade das fibras extrínsecas que provêm do ligamento periodontal (Nanci & Bosshardt, 2006).



**Figura 4.** Corte seccional do osso alveolar da maxila que suporta as raízes dentárias (indicadas pelas setas) (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

## **1.2. Classificação da Doença Periodontal**

A doença periodontal é uma doença progressiva e imuno-inflamatória causada pela presença de bactérias que levam à destruição dos tecidos do periodonto (Silva et al., 2015; Meyle & Chapple, 2015; Harvey, 2017; Nedzi-Góra, Kowalski, & Górska, 2017). A inflamação dos tecidos leva à perda do tecido conjuntivo e osso, que dá origem a um espaço onde outrora ocorria a ligação entre tecidos periodontais e dente, designado por bolsa periodontal. A bolsa periodontal é a consequência da migração do

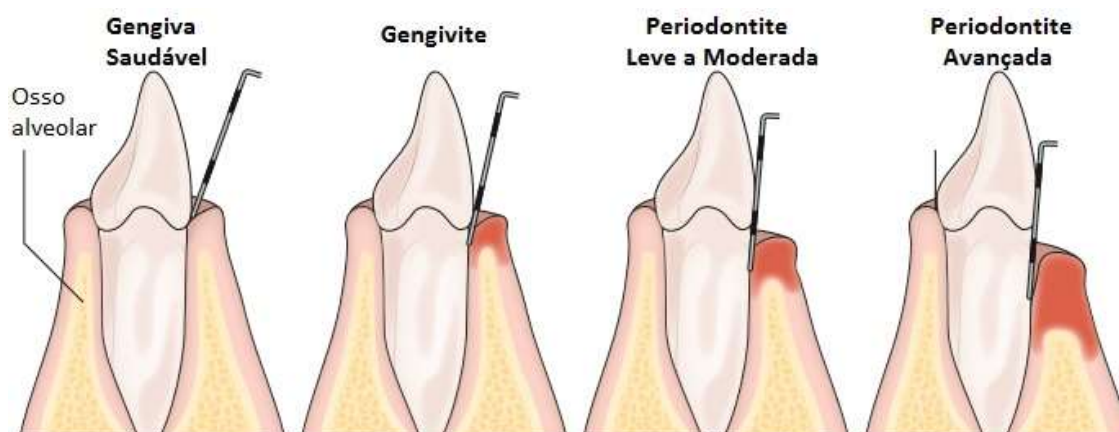
epitélio juncional na direcção apical da raiz (Nanci & Bosshardt, 2006; Silva et. al, 2015).

Doença periodontal é um termo que compreende duas condições patológicas: gengivite e periodontite. Na primeira, existe apenas uma inflamação gengival causada pelas bactérias presentes na margem gengival. Se estas bactérias não forem removidas por um meio mecânico, a doença progride para a forma mais avançada da doença, a periodontite. Nesta condição, ocorre perda irreversível dos tecidos periodontais devido à progressão da inflamação e surgem, assim, as bolsas periodontais (Antonini et al., 2013; Kinane et al., 2017; Harvey, 2017).



**Figura 5.** Medição de bolsa periodontal com sonda periodontal graduada (Adaptado de Nyman & Lindhe, 2003).

A gengivite não tem, obrigatoriamente, de evoluir para periodontite, mas a periodontite é precedida pela gengivite. A periodontite pode apresentar variadas formas: de progressão mais lenta e menos invasiva, em que é considerada crónica, ou numa versão em que a destruição tecidual é mais rápida e invasiva e, neste caso, designa-se por periodontite agressiva (Antonini et al., 2013; Kinane et al., 2017; Harvey, 2017).



**Figura 6.** Várias fases da doença periodontal (Traduzido e adaptado de Kinane et al., 2017).

O depósito de bactérias nos locais onde existe doença periodontal pode levar a uma bacteremia que causa outras doenças sistêmicas. Sabe-se, por ter sido largamente estudado, que as bactérias localizadas nas bolsas periodontais estão amplamente associadas a endocardite infecciosa, doenças cardiovasculares através da formação de ateromas nos vasos sanguíneos, *diabetes mellitus*, infecções respiratórias e até nascimento prematuro de bebês com baixo peso (Harvey, 2017).

### 1.3. Mecanismos da Doença Periodontal

O principal factor etiológico da doença periodontal é a presença do biofilme bacteriano, muito embora se saiba que não é consequência única para a doença se iniciar já que o biofilme, por si só, não consegue causar a doença. Entre os factores responsáveis pela iniciação da doença periodontal estão também a genética, o sistema imunitário, o ambiente, os comportamentos e a medicação tomada, o que faz desta doença uma condição multifactorial e de elevada complexidade (Meyle & Chapple, 2015; Harvey, 2017).

A formação da placa bacteriana inicia-se, essencialmente, com bactérias aeróbias que aderem, através de adesinas, às superfícies duras da cavidade oral – como o esmalte, dentina ou cimento – quando não se procede à higienização local. Posteriormente, com o aumento das camadas bacterianas, a quantidade de oxigénio vai diminuindo e o local torna-se propício à adesão de bactérias anaeróbias gram-negativas



através de uma ligação entre bactérias aeróbias e anaeróbias provavelmente conseguida através da *Fusobacterium nucleatum*, que tem capacidade de ligação a todas as moléculas da placa bacteriana. Se esta última não for removida, sofre uma calcificação e passa a chamar-se tártaro. O tártaro, tanto sub- como supra-gengival, está bastante associado à doença periodontal e não se consegue remover com a escovagem simples. Para além disso, esta calcificação, devido à sua localização e rugosidades, funciona como depósito de mais bactérias, o que provoca o seu aumento (Larsen & Fiehn, 2017; Harvey, 2017).



**Figura 7.** Imagem da arcada inferior de paciente periodontal antes (A) e após (B) destartarização (Adaptado de Nyman & Lindhe, 2003).

Entre as bactérias anaeróbias mais conhecidas da doença periodontal estão a *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e a *Treponema denticola*, que são consideradas periopatogénicas e desencadeiam processos de imunidade inata, adaptativa e inflamatória (Silva et. al, 2015; Nedzi-Góra et al., 2017). A resposta do sistema imunitário do hospedeiro desencadeia libertação de mediadores pró-inflamatórios como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e prostaglandina E2 (PGE2), cujo papel tem vindo a ser conhecido na destruição do osso alveolar na doença periodontal (Nedzi-Góra et al., 2017; Harvey, 2017). Também actuam, associados à imunidade adaptativa, linfócitos T e B, que funcionam como principais fontes de activador do receptor do

ligando do factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL, do inglês *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). O RANKL permite a activação do RANK, que participa na diferenciação dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção do osso alveolar característica da periodontite (Cekici et al., 2014; Harvey, 2017).

Quando há um estímulo inflamatório, os neutrófilos polimorfonucleares são das primeiras células a chegar ao local inflamado. Têm uma capacidade de fagocitose das células bacterianas e a sua desgranulação no local provoca a libertação de enzimas que têm a capacidade de degradar tecidos adjacentes e matriz extracelular (Silva et. al, 2015), como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). Numa situação equilibrada, estas MMPs ligam-se a receptores chamados tecidos inibidores de metaloproteinases (TIMPs); caso haja desequilíbrio, as MMPs iniciam a decomposição do tecido conjuntivo (Nedzi-Góra et al., 2017).

Os macrófagos, que têm capacidade fagocitária, são outro tipo de células que se deslocam até ao local de inflamação periodontal. Para além da função previamente conhecida de fagocitose realizada por estas células, sabe-se agora que estas têm receptores que permitem a ligação a antígenos patogénicos. Esta ligação desencadeia, no local, a secreção pelas células do hospedeiro de mais mediadores pró-inflamatórios, propagando a inflamação (Nedzi-Góra et al., 2017).

A destruição tecidular característica desta patologia deve-se, resumidamente, a um desequilíbrio entre a resposta imunitária e a inflamação (Cekici et al., 2014).



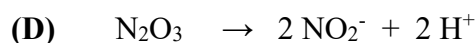
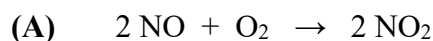
## 2. ÓXIDO NÍTRICO

---

### 2.1. Características do Óxido Nítrico

O óxido nítrico é uma molécula radicalar altamente reactiva. Em condições normofisiológicas, desempenha o seu papel como mensageiro em processos de neurotransmissão, regulação do tónus vascular e participa na imunidade do hospedeiro, desempenhando, portanto, um importante papel a nível cardiovascular, a nível do sistema nervoso central e a nível imunológico. Assim, prevê-se que quando existem alterações na quantidade desta molécula mensageira, possam ser desencadeados processos fisiopatológicos. O que distingue o seu carácter fisiológico ou nocivo são as condições em que este é sintetizado, as células que o produzem ou com as quais entra em contacto, as quantidades em que é produzido e qual o seu destino químico (Barreto, Correia & Muscará, 2005; Çanarçi & Doğan, 2014).

O óxido nítrico é um gás no seu estado puro, apesar de ter solubilidade elevada em meios apolares, pelo que, em meio biológico, é encontrado em membranas e proteínas. Ao reagir com o oxigénio ( $O_2$ ), o NO dá origem a dióxido de nitrogénio ( $NO_2$ ). **(Reacção A)** O  $NO_2$ , por sua vez, reage com NO ou com outra molécula de  $NO_2$  e dá origem a trióxido de dinitrogénio ( $N_2O_3$ ) **(Reacção B)** ou tetróxido de dinitrogénio ( $N_2O_4$ ) **(Reacção C)**, respectivamente. O  $N_2O_3$  e o  $N_2O_4$  são espécies que reagem rapidamente com a molécula de água ( $H_2O$ ) e dão origem a nitrito ( $NO_2^-$ ) e a nitrato ( $NO_3^-$ ) **(Reacção D e E, respectivamente)**. Por conseguinte, os nitratos e nitritos são considerados os metabolitos finais da oxidação do NO (Cerqueira & Yoshida, 2002; Barreto et al., 2005).

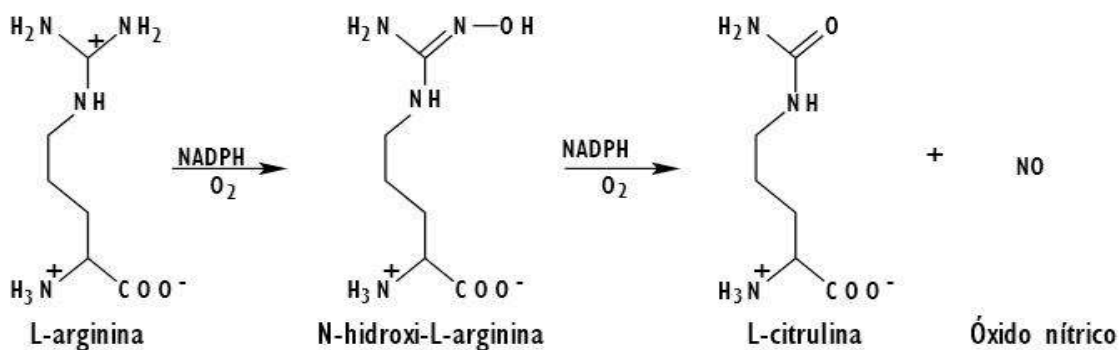


Actualmente, sabe-se que existem duas vias de produção do óxido nítrico: a via clássica L-arginase – NO, realizada pelas sintases do óxido nítrico, e a via alternativa nitrato – nitrito – óxido nítrico (Zhao, Vanhoutte & Leung, 2015).

## 2.2. Biossíntese do NO

### 2.2.1. Via L-Arginase – NO

A L-arginina é o aminoácido do qual provem o óxido nítrico sintetizado pela via clássica L-arginina – NO. Este processo resulta na conversão deste aminoácido em L-citrulina e NO e envolve duas fases. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogénios da L-arginina, gerando N-hidroxi-L-arginina. Como co-substratos desta hidroxilação temos o oxigénio molecular e o dinucleotido nicotinamida adenina na sua forma reduzida e fosfatada (NADPH), que funciona como fornecedor de electrões. Na etapa que se segue, a N-hidroxi-L-arginina sofre uma oxidação e é convertida em L-citrulina, com a consequente libertação de NO. Para que ocorra a produção de NO através da conversão da L-arginina em L-citrulina são necessários vários co-factores redox como o mononucleótido de favina (FMN), o dinucleótido de favina e adenina (FAD), a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e um grupo heme (Förstermann & Sessa, 2012; Lorin et al., 2013; Zhao et al., 2015). Este processo de síntese do NO depende de uma família de enzimas citosólicas conhecidas como sintases do óxido nítrico (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*) (Förstermann & Sessa, 2012; Lorin et al., 2013).



**Figura 8.** Formação de Óxido Nítrico a partir de L-arginina, numa reacção catalisada pela NOS (Adaptado de Dusse et al., 2003).

### 2.2.2. Via Nitrato – Nitrito – Óxido Nítrico

O nitrato e o nitrito foram, até determinada altura, considerados produtos da oxidação do óxido nítrico com propriedades indesejadas para o organismo (Lundberg, Weitzberg & Gladwin, 2008). Contudo, sabe-se hoje em dia, que estes iões não só produzem óxido nítrico, como se reconhece que têm funções fisiológicas importantes no organismo. Por exemplo, desempenham um papel na regulação da pressão sanguínea e têm um efeito vasodilatador em condições de hipóxia (Kim-Shapiro & Gladwin, 2014).

Tal como visto na secção anterior, na via clássica de formação de óxido nítrico (via L-arginina – óxido nítrico), o oxigénio é um co-substrato essencial à reacção. Porém, se o sistema entrar num estado de hipoxia, é progressivamente activada a via nitrato – nitrito – óxido nítrico. Apesar de não se saber exactamente em que momento e com que níveis de oxigénio a última via é activada, esta tem vindo a ser considerada um complemento à via clássica de formação de óxido nítrico por permitir manter os níveis deste necessários ao funcionamento fisiológico dos organismos num meio com falta de oxigénio. Esta via caracteriza-se pela redução do nitrato a nitrito e, em seguida, pela redução deste a óxido nítrico (Lundberg et al., 2008).

#### Redução do Nitrato a Nitrito:

Inicialmente, o  $\text{NO}_3^-$  é convertido em  $\text{NO}_2^-$ . A sialina, expressa em vários tecidos, é uma proteína membranar que funciona como transportadora de aniões inorgânicos e tem principal destaque nas glândulas parótida, submandibular, tiróide, no cérebro, fígado, rim e pâncreas. Esta proteína permite o transporte do nitrato desde a circulação sanguínea até às glândulas salivares (Qu et al., 2016).

As bactérias presentes na cavidade oral são essenciais para o início da via nitrato – nitrito – óxido nítrico (Bryan & Loscalzo, 2011). São as bactérias anaeróbicas que se encontram nas criptas profundas da região posterior da língua que reduzem o nitrato a nitrito através de redutases do nitrato (Qu et al., 2016).

#### Redução do Nitrito a Óxido Nítrico:

Em condições de hipóxia, onde existe uma redução da tensão de oxigénio, a oxihemoglobina transforma-se em desoxihemoglobina (desoxiHb) através de uma

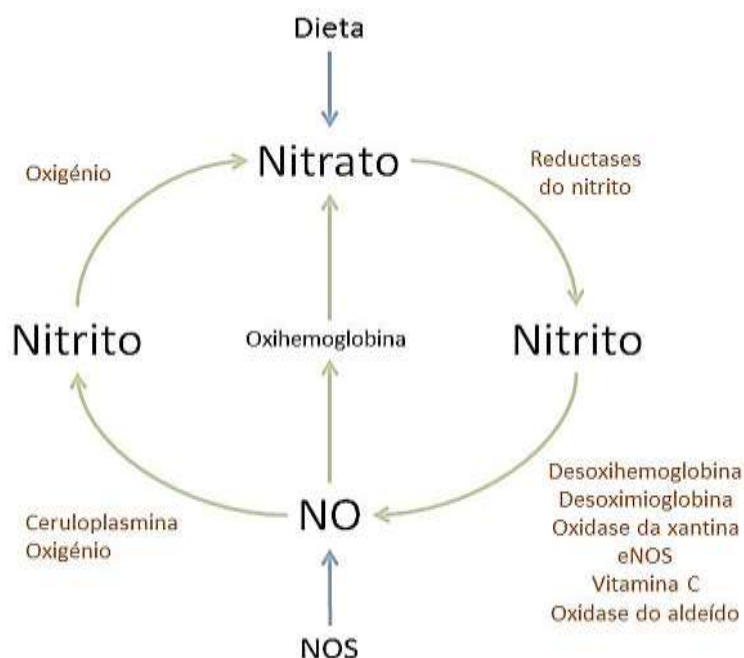
mudança na sua estrutura quaternária (Zhao et al., 2015). A desoxiHb funciona como uma enzima redutase de nitrito. O nitrito reage com o ferro presente na desoxihemoglobina ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) e com um próton ( $\text{H}^+$ ) para formar o óxido nítrico (NO) e metahemoglobina ( $\text{HbFe}^{3+}$ ). **(Reacção I)**



Posteriormente, o NO formado através da redução do nitrito, reage com uma nova desoxihemoglobina e forma a hemoglobina nitrosil ferrosa ( $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO}$ ). **(Reacção II)**



Após análise destas reacções, é possível considerar-se a hemoglobina como uma enzima que, em situações em que a concentração de oxigénio está diminuída, tem uma acção na sinalização e vasodilatação hipóxicas, uma vez que permite a formação de NO através da redução do nitrito (Lundberg et al., 2008).



**Figura 9.** Ciclo do nitrato – nitrito – NO (Adaptado e traduzido de Lundberg et al., 2009).

Para além da hemoglobina, também outras proteínas como a neuroglobina, citoglobina e mioglobina actuam como redutases do nitrito com o objectivo de formar NO de uma maneira independente das sintases do óxido nítrico, através de mecanismos idênticos aos referidos anteriormente. No entanto, a produção de NO pela desoximioglobina é concisamente superior à produzida pelas outras globinas (Kim-Shapiro & Gladwin, 2014).

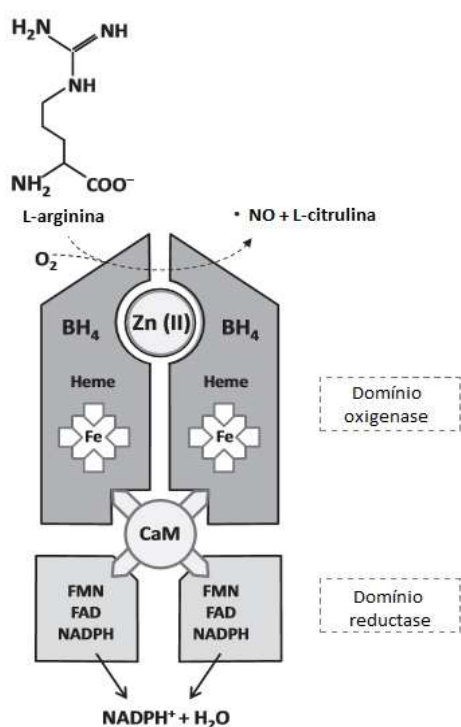
Outras proteínas como a oxidase do citocromo *c* mitocondrial, a eNOS, a oxidase do aldeído e ainda a oxirredutase da xantina (esta última em anoxia) têm capacidade de participar na manutenção da concentração de NO formado a partir da redução do nitrito (Lundberg et al., 2008; Zhao et al., 2015).

Apesar de estes produtos finais do óxido nítrico serem considerados como estáveis e inertes, percebe-se agora que, em condições específicas, eles tem a capacidade de se reciclarem e produzirem, novamente, óxido nítrico (Bryan & Loscalzo, 2011).

### 2.3. Sintases do Óxido Nítrico – NOS

As enzimas NOS são dímeros que funcionam como dioxigenases formados por dois domínios: o domínio redutase (C-terminal) e o domínio oxigenase (N-terminal)

(Förstermann & Sessa, 2012; Lorin et al., 2013).



**Figura 10.** Estrutura molecular da enzima NOS (Traduzida e adaptada de Lorin et al., 2013).

É o domínio N-terminal (oxigenase) que se liga ao substrato L-arginina, ao grupo heme, ao co-factor BH<sub>4</sub> e ao oxigénio molecular. No domínio C-terminal (redutase), dá-se a união aos co-factores FMN, FAD e ao co-substrato NADPH, do qual são transferidos electrões para o domínio amino-terminal (oxigenase) (Förstermann & Sessa, 2012; Lorin et al., 2013).

São conhecidas três isoformas destas enzimas: a sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS ou NOS1), a sintase do óxido nítrico induzida (iNOS ou NOS2) e a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS ou NOS3). As isoformas nNOS e eNOS são consideradas sintases constitutivas. Todas as isoformas utilizam a L-arginina como substrato, o NADPH e o O<sub>2</sub> como co-substrato e FMN, FAD, BH<sub>4</sub>, calmodulina (CaM) e um grupo heme como co-factores (Lorin et al., 2013).



**Figura 11.** Isoformas da NOS (Adaptado de Dusse et al., 2003).

Nas sintases nNOS e eNOS, a ligação à calmodulina é maior na presença de concentrações elevadas de Ca<sup>2+</sup> (entre 200 a 400nM), e, por isso, considera-se que estas sintases constitutivas são cálcio-dependentes. Considera-se activada a enzima que está ligada à CaM uma vez que é esta que permite uma maior afluência dos electrões cedidos pelo NADPH, desde o domínio C-terminal ao domínio N-terminal. Já a enzima iNOS consegue com facilidade uma ligação à calmodulina, independentemente da presença ou ausência de Ca<sup>2+</sup>, uma vez que esta enzima não depende do aumento da concentração deste ião. Esta independência permite-lhe funcionar em perfeitas condições em concentrações de cálcio reduzidas (abaixo de 40 nM) (Förstermann & Sessa, 2012).

Até à data, sabe-se que as moléculas com estruturas análogas à L-arginina servem como inibidoras das isoformas da enzima NOS e, destas, conhece-se: NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitroL-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name). Para além destes análogos da L-arg, que se ligam à NOS em vez da arginina, também a aminoguanidina tem afinidade para a enzima iNOS. Uma vez que se associam quantidades de óxido nítrico elevadas a patologias do organismo, seria extremamente importante compreender profundamente o funcionamento das isoformas da enzima NOS, de modo a ser possível utilizar inibidores com funções terapêuticas (Dusse, Vieira & Carvalho, 2003).

- **Sintase do óxido nítrico neuronal – nNOS:**

A nNOS é encontrada em neurónios específicos do cérebro e produz óxido nítrico tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. Para além de ser encontrada em tecidos do cérebro, encontra-se também em células da mácula densa do rim e células pancreáticas, músculo esquelético, gânglios simpáticos e glândulas suprarrenais, nervos nitrérgicos periféricos, células epiteliais, região sexual masculina e medula espinhal (Cerqueira & Yoshida, 2002; Förstermann & Sessa, 2012).

O óxido nítrico produzido pela nNOS tem funções na regulação de neurotransmissores como a acetilcolina, histamina e serotonina e na vasodilatação através de nervos periféricos (Zhao et al., 2015). Regula a excitabilidade ou depressão neuronal e, assim, trabalha sobre a plasticidade sináptica, o que interfere nos processos de memória e aprendizagem (Förstermann & Sessa, 2012; Zhao et al., 2015). Os nervos nitrérgicos com presença de nNOS provocam um relaxamento do corpo cavernoso e por isso permitem a erecção peniana. Por este motivo, quando se detectam indivíduos com níveis de nNOS diminuídos, é comum estes sofrerem de disfunção erétil (Förstermann & Sessa, 2012).

- **Sintase do óxido nítrico induzida – iNOS:**

A iNOS é uma enzima raramente expressa em situações fisiológicas, estando presente em condições de inflamação, causada principalmente por lipopolissacáridos bacterianos e citocinas pro-inflamatórias. Este estímulo inflamatório tem como objectivo final a extinção dos microrganismos patológicos (Shaker, Ghallab, Hamdy &

Sayed, 2013). É uma enzima independente da concentração de cálcio e, depois de activada, a sua actividade não cessa (Förstermann & Sessa, 2012).

A iNOS é encontrada inicialmente em macrófagos e a expressão destes gera grandes quantidades de óxido nítrico, durante um longo período de tempo (Förstermann & Sessa, 2012). Presume-se que esta enzima sintetize óxido nítrico com diferentes funções e em concentrações 1000 vezes maiores do que as produzidas pelas restantes NOS (Cerqueira & Yoshida, 2002). Altas concentrações de óxido nítrico podem interferir com o ADN celular e provocar a sua fragmentação, o que lhe confere uma propriedade citoestática e citotóxica. As propriedades tóxicas do óxido nítrico permitem não só uma acção contra os microrganismos patológicos e células tumorais, mas também contra células vizinhas que não constituem o alvo inicial de defesa imunológica. É por este motivo que a actividade fisiopatológica do óxido nítrico está relacionada com a iNOS (Förstermann & Sessa, 2012). A transcrição do gene da iNOS, que produz óxido nítrico inflamatório, é activada pelas citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que são produzidas por macrófagos activados ou por LPS, sendo estas as responsáveis pela sua síntese. Como depende de transcrição genética, a activação da iNOS é muito mais lenta do que a activação das outras NOS, que são constitutivas. Enquanto as enzimas constitutivas, eNOS e nNOS, conseguem produzir óxido nítrico com rapidez e de uma maneira controlada e pontual em pequenas concentrações, a iNOS tem uma resposta mais lenta na formação de grandes quantidades de óxido nítrico que, por serem elevadas, são consideradas citotóxicas (Kendall, Marshall & Bartold, 2001; Guzik, Korbout & Adamek-Guzik, 2003).

- **Sintase do óxido nítrico endotelial – eNOS:**

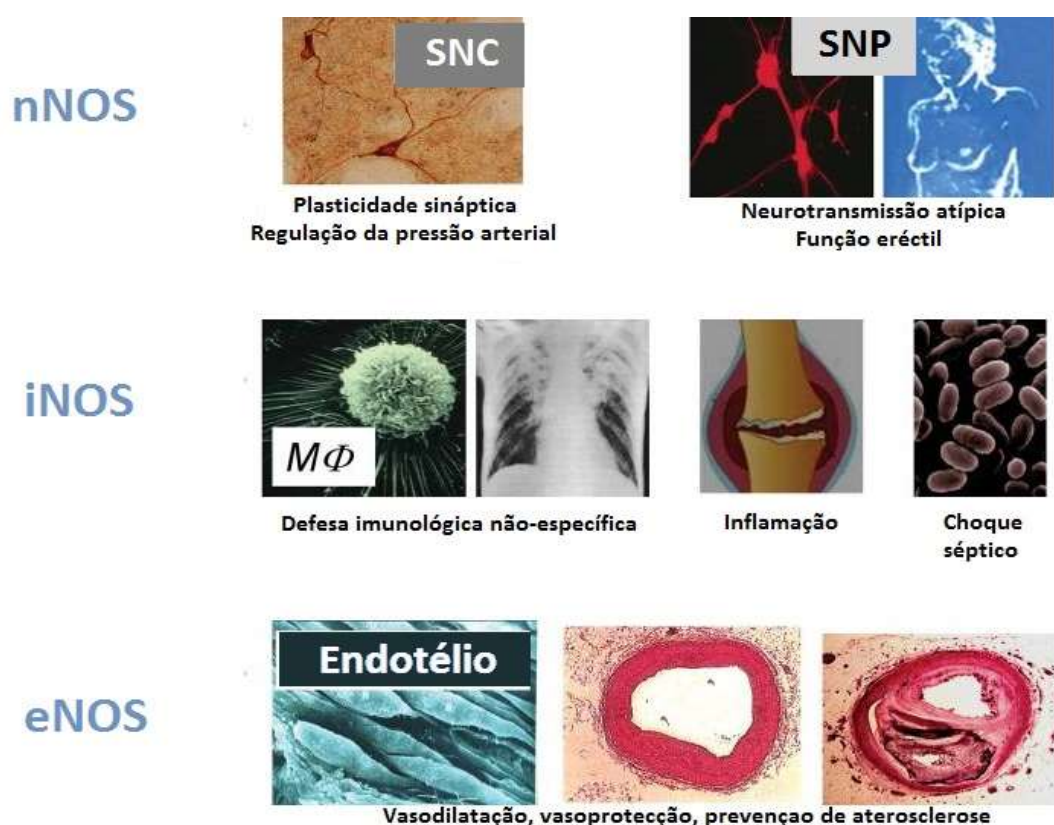
A eNOS é uma das enzimas constitutivas que está presente nas células do endotélio, embora também tenha sido detectada em plaquetas, células epiteliais tubulares do rim, neurónios e músculo cardíaco (Förstermann & Sessa, 2012).

O óxido nítrico proveniente da eNOS está associado a um aumento do monofosfato cíclico de guanósina (cGMP, do inglês *cyclic Guanosine Monophosphate*) e da guanilil ciclase, o que provoca a dilatação de todos os vasos sanguíneos, e que lhe confere uma característica reguladora da pressão sanguínea. Tem uma actividade protectora relativamente à formação de ateromas: inibe ou impede a união da molécula CD11/CD18 – molécula de adesão dos leucócitos – às paredes dos vasos sanguíneos (Förstermann & Sessa, 2012).



Quando existe uma disfunção do endotélio – nas doenças cardiovasculares, por exemplo – ocorre uma diminuição na actividade da eNOS e na consequente bioactivação de óxido nítrico, o que provoca a desregulação da homeostase da pressão sanguínea. Para além disso, nas doenças cardiovasculares há produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Specie*) como enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, oxidases de NADPH, eNOS desacopladas e oxidases de xantina. Para além desta condição de *stress* oxidativo, o óxido nítrico tem, ainda, tendência a reagir com o superóxido ( $O_2^-$ ), o que diminui a sua biodisponibilidade (Lorin et al., 2013).

Esta eNOS consegue produzir óxido nítrico de uma forma dependente e independente de cálcio. A acetilcolina, bradiquinina e histamina aumentam a concentração de cálcio intracelular através da sua união a um receptor específico da sintase e assim, como previamente conhecido, é provocada a ligação à calmodulina e a consequente activação da enzima. Por outro lado, as cinases conseguem regular a actividade da eNOS ao ligarem-se a sítios específicos de fosforilação desta. Dependendo do local, a enzima é activada ou inibida (Zhao et al., 2015).



**Figura 12.** NOS e as suas funções (Traduzido e adaptado de Förstermann & Sessa, 2012).

### **3. ÓXIDO NÍTRICO E DOENÇA PERIODONTAL**

---

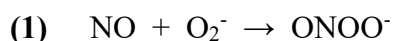
Quando existem toxinas microbiológicas ou um estímulo nocivo, inicia-se um processo de defesa pela parte do organismo que se caracteriza por inflamação. Este processo inactiva ou destrói os organismos nocivos e inicia uma reparação do tecido afectado através de respostas imunitárias de carácter específico e não-específico. Numa primeira fase da inflamação, a permeabilidade vascular aumenta e são libertados péptidos como a interleucina-1, bem como aminas como a histamina ou a 5-hidroxitriptamina. Contudo, se existir uma desregulação ao nível das células imunitárias e inflamatórias, a resposta aos organismos patogénicos é exacerbada e pode provocar destruição não só dos agentes microbianos como das células saudáveis do hospedeiro (Guzik et al., 2003).

A doença periodontal é iniciada por uma inflamação dos tecidos que circundam o dente e nos quais se desenvolve uma resposta imune excessiva em relação à presença de placa bacteriana. Numa fase inicial, existe uma resposta das células endoteliais e dos leucócitos ao biofilme bacteriano, o que provoca modificações histológicas nos tecidos que não são observáveis clinicamente. Depois, o epitélio juncional produz óxido nítrico em resposta aos produtos metabólicos das bactérias, através de monócitos, citocinas e neuropéptidos, o que induz a vasodilatação local. A vasodilatação permite que os neutrófilos, macrófagos e linfócitos migrem até ao tecido conjuntivo e possam dar continuação à resposta inflamatória. Por tal motivo, no tecido inflamado é característico encontrarem-se as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , bem como células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, que são grandes produtoras de ROS e RNS. Entre estas espécies reactivas de oxigénio e azoto, encontramos o óxido nítrico (Kinane et al., 2017).

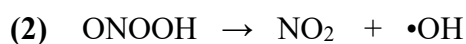
Como referido anteriormente, o óxido nítrico, para além das suas funções como neurotransmissor, relaxante muscular e inibidor de agregação plaquetária, é um radical de grande importância na imunidade e nos processos inflamatórios, e desempenha acções protectoras, reguladoras e destrutivas. Pode ter um papel benéfico na defesa contra microrganismos, mas, se em grandes quantidades, tem um desempenho nocivo contra as células do hospedeiro. Neste campo, a actividade do NO considera-se bem mais complexa (Coleman, 2001, Çanarçi & Doğan, 2014).

### 3.1. Formação de Agentes Oxidantes

Tal como já foi referido, o óxido nítrico é citotóxico em quantidades elevadas, porque se mostra disponível para reagir com outras biomoléculas e, assim, formar compostos tóxicos para as células (Kendall et al., 2001). A produção de grandes quantidades de óxido nítrico “inflamatório”, produzido pela iNOS, é, geralmente, acompanhada por uma grande produção do anião superóxido (Guzik et al., 2003). As oxidases de NADPH e as oxidases de xantina são as responsáveis pela produção desta espécie nos macrófagos, a qual é obtida através de uma reacção de redução do oxigénio. O superóxido, assim formado, apenas é desactivado pela enzima dismutase do superóxido (SOD, do inglês *superoxide dismutase*). No entanto, o óxido nítrico e o superóxido tem a capacidade de reagir um com o outro, com extrema rapidez, sem ser necessário qualquer tipo de enzimas, que retardariam o processo. Isto faz do óxido nítrico a única molécula que, devido às grandes concentrações e à rapidez da reacção com o  $O_2^-$ , consegue competir com a SOD. Note-se que o óxido nítrico e o superóxido reagem entre si mesmo que não tenham sido produzidos na mesma célula, uma vez que o NO tem uma alta capacidade de se difundir entre elas. Da reacção resulta uma espécie reactiva do azoto (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Specie*) com actividade citotóxica: o peroxinitrito (**Reacção 1**) (Guzik et al., 2003; Pacher, Beckman & Liaudet, 2007).



O peroxinitrito pode apresentar-se na sua forma não protonada ( $ONOO^-$ ) ou protonada ( $ONOOH$ ), caso se encontre em pH neutro, e assim originar novas moléculas com funções em mecanismos fisiológicos e patológicos (**Reacção 2**) (Virág, Szabó, Gergely & Szabó, 2003; Barreto et al., 2005):



### 3.2. Citotoxicidade do peroxinitrito

A maior parte das moléculas radicalares influencia os processos biológicos ao alterarem a formação, estrutura e função das células. Isto acontece porque os radicais são altamente capazes de reagir com lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos. O peroxinitrito é um desses radicais que, tal como descrito na secção anterior, é formado pela reacção entre o NO e o  $O_2^-$  em tecidos onde decorre uma inflamação, como é o caso de tecidos periodontais durante a doença periodontal, sendo apontado como a principal causa de citotoxicidade do óxido nítrico (Ahmad, Rasheed & Ahsan, 2009). Em particular, o peroxinitrito é responsável por danos oxidativos, nitração e *S*-nitrosilação em biomoléculas como lípidos, proteínas e ADN, revelando ter um efeito citotóxico e mutagénico nas células, o que conduz a processos de morte celular – apoptose, necrose, ou um processo misto (Ahmad et al., 2009; Förstermann & Sessa, 2012). Para além disso, o peroxinitrito ainda aumenta a biossíntese de IL-8, que é uma citocina produzida por leucócitos responsável pela activação de neutrófilos, sendo responsável por propagar a inflamação já existente (Pacher et al., 2007).

### 3.3. Modificação de proteínas – Nitração da tirosina

Os PMNs e os macrófagos são uma fonte importante de NO e  $O_2^-$ , ou seja, de peroxinitrito. É também nos PMNs que se produz a enzima mieloperoxidase, que interage com o peroxinitrito para dar início ao processo de modificação proteica. A tirosina é um aminoácido que sofre nitração pelo peroxinitrito, dando origem à nitrotirosina, que está presente no tecido gengival quando existe doença periodontal (Lohinail et al., 2001). A nitrotirosina forma-se através da adição de um grupo nitro ( $NO_2^-$ ) ao grupo hidroxila do anel aromático da tirosina presente numa proteína (Pacher et al., 2007). Este é um processo complexo que depende de alguns factores no local como: o pH, a concentração de  $CO_2$  e a presença de glutathiona. Após estudos *in vitro* realizados para testar a nitração de tirosina, deBoer et. al (2014) demonstrou que, na presença de glutathiona, a produção de nitrotirosina aumenta ligeiramente. Para explicar este aumento, propôs-se a hipótese de ocorrer uma nitrosilação da glutathiona pelo óxido nítrico, formando-se *S*-nitrosoglutationa (GSNO) que serve de armazém de NO no local e, assim, aumenta a sua biodisponibilidade para servir como precursor da nitração da

tirosina. Também na presença de concentrações de  $\text{CO}_2$  elevadas, a produção de nitrotirosina é aumentada. O  $\text{CO}_2$  reage com o peroxinitrito para formar nitrosoperoxicarbonato ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ). Parte deste  $\text{ONOOCO}_2^-$  sofre uma decomposição por enzimas homolíticas e dá origem ao radical carbonato ( $\text{CO}_3^-$ ) e ao dióxido de nitrogénio ( $\text{NO}_2$ ), que participam na produção da nitrotirosina ao reagir com o resíduo de tirosina, em condições fisiológicas. No entanto, quando há diminuição de pH, como em situações de inflamação, existe predominância da forma protonada do peroxinitrito, o ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), em detrimento do  $\text{ONOOCO}_2^-$ , e passa a ser este ácido o precursor da nitrotirosina através da sua decomposição em radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) e dióxido de nitrogénio ( $\text{NO}_2$ ) (Pacher et al., 2007; deBoer, Palomino, Idiga, Millhauser & Mascharak 2014). As modificações oxidativas causadas pelo peroxinitrito que dão origem a nitrotirosina fazem com que esta seja um indicador de oxidações indesejadas nas proteínas do organismo e um marcador biológico da presença de  $\text{ONOO}^-$  (Ahmad et al., 2009). Ao sofrer nitração, a proteína sofre uma modificação na sua estrutura e consequentemente, da sua função. Isto pode originar, directamente, uma desintegração do ligamento periodontal, bem como a formação de antigénios no tecido periodontal, o que induz a formação de auto-anticorpos contra o periodonto. Para além disso, ao ocorrer nitração do resíduo tirosina presente na enzima superóxido dismutase, esta enzima, que tem como função inactivar o  $\text{O}_2^-$ , fica automaticamente modificada e inactiva, permitindo uma maior disponibilidade do superóxido para reagir com o óxido nítrico, formar peroxinitrito e, deste modo, levar a um ciclo inflamatório (Lohinail et al., 2001; Pacher et al., 2007).

### 3.4. Peroxidação lipídica

O peroxinitrito é responsável pela peroxidação de lípidos, o que origina radicais lipídicos que, por sua vez, levam à destruição da membrana lipídica (Pacher et al., 2007).

O peroxinitrito pode ser apresentado na sua forma protonada, e assim, decompor-se nos radicais altamente reactivos  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{NO}_2$ , os quais iniciam a peroxidação lipídica ao reagir com a membrana dos ácidos gordos polinsaturados. O ácido gordo contém na sua fórmula um carbono alílico cujo hidrogénio é, inicialmente, capturado por um radical, transformando assim o lípido (L) num radical lipídico ( $\text{L}^\bullet$ ). De seguida, na fase

de propagação, o  $L\bullet$  reage com o oxigénio molecular e forma um radical peroxil lipídico ( $LOO\bullet$ ). Este radical reage, novamente, com o hidrogénio de outro lípido e gera um ciclo de peroxidação lipídica. Ao reagirem,  $H^+$  e  $LOO\bullet$  formam um hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ). Este ciclo chega ao fim quando deixa de existir substrato disponível, ou quando existe emparelhamento de radicais lipídicos com formação de produtos mais estáveis (Hall, Wang, Bosken & Singh, 2016).

O malondealdeído (MDA) é um produto final do processo de peroxidação dos lípidos e tem sido detectado, em vários estudos, na presença de doença periodontal. Uma vez que nos estudos realizados se encontra sempre MDA na saliva, fluido gengival crevicular (FGC) e sangue de indivíduos com periodontite, tal facto permite concluir que a peroxidação lipídica está associada à doença periodontal e que este composto pode vir a ser futuramente considerado um dos biomarcadores desta (Fentoğlu et al., 2015).

### **3.5. Produção de metaloproteinases da matriz**

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases com características estruturais e catalíticas bem definidas; representam um dos factores mais importantes no desenvolvimento da doença periodontal porque têm um desempenho activo na destruição dos constituintes da matriz extracelular. No ser humano, são conhecidas 23 formas que são divididas em seis grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, metaloproteinases tipo membrana e outras metaloproteinases (Sapna, Gokul & Bagri-Manjrekar, 2014).

Apesar do mecanismo não ter sido, ainda, profundamente estudado, reconhece-se que o peroxinitrito é capaz de induzir a produção de MMPs ao interagir com a glutathione (Pacher et al., 2007). O colagénio tipo-I é um dos principais componentes do tecido conjuntivo gengival e da matriz extracelular dos tecidos periodontais e a sua degradação representa uma forte actividade da doença periodontal. Mesmo nas primeiras fases da doença, onde apenas existe inflamação gengival, o colagénio já sofre degradação para dar lugar ao infiltrado inflamatório. As collagenases MMP-8 e a MMP-13 têm os principais papéis na doença periodontal, e contam com o contributo das MMP-9 e MMP-14 (Sapna et al., 2014; Cavalla, Hernández-Ríos, Sorsa, Bigueti & Hernández, 2017).

Na doença periodontal existe um grande afluxo de neutrófilos e leucócitos, que são a maior fonte de MMP-8. A MMP-8 é responsável por degradar colagénio tipo-I e tipo-III e está associada à severidade da doença periodontal, sendo maior a sua presença quando se verificam bolsas periodontais com maior profundidade, o que significa maior perda de tecido e inserção periodontal (Gupta, Gupta, Gupta, Khan & Bansal, 2015). É nesta fase que se percebe que a resposta exagerada do hospedeiro aos microrganismos bacterianos leva à destruição tecidual, já que há uma produção exacerbada de neutrófilos polimorfonucleares, cujo aumento implica uma maior presença de MMP-8 no fluido gengival crevicular (Sapna et al., 2014; Cavalla et al., 2017). Esta MMP-8 não está presente em locais saudáveis mas, quando existe periodontite, induz o processamento de algumas citocinas, agravando a inflamação já existente, e degrada o colagénio da gengiva e do ligamento periodontal, no decorrer na doença (Gupta et al., 2015). A forte presença da MMP-8 na doença periodontal pode fazer com que, no futuro, esta possa vir a ser considerada como um biomarcador da doença, uma vez que é a enzima com maior capacidade catalítica de degradar o colagénio. Também a MMP-13 actua numa fase mais avançada da doença periodontal: causa reabsorção óssea e activa a produção de pró-MMP-9. Por conseguinte, estas duas enzimas (MMP-13 e MMP-9) estão associadas à destruição do osso alveolar (Sapna et al., 2014; Cavalla et al., 2017).

### **3.6. Danos no ADN**

O peroxinitrito proveniente do NO é responsável pela morte celular através de modificações provocadas nas moléculas de ADN (Lohinai et al., 2003; Pacher & Szabo, 2008; Ahmad et al., 2009; Islam et al., 2015).

O ADN tem na sua base purinas, que são bastante reactivas com oxidantes, e as desoxirriboses, que sofrem clivagem (Islam, Habib, Ali, Moinuddin & Ali, 2016). O peroxinitrito, principalmente formado através de macrófagos, tem a capacidade de se difundir por membranas celulares e atingir o núcleo, onde causa dano. Reage com uma purina presente na base do ADN, nomeadamente a guanina (G), para formar nitroguanina. Esta transformação leva a guanina a abandonar a base do ADN a qual fica, assim, com um espaço por preencher. Este espaço pode ser preenchido por outra base

que não seja a guanina, como a adenina, citosina ou timina. Estas modificações podem levar a mutações ou mesmo à ruptura da molécula de ADN (Islam et al., 2015).

No contexto da doença periodontal, a acção do peroxinitrito sobre os processos fisiológicos do ADN culmina na activação da polimerase poli(ADP-ribose) (PARP). A PARP é uma enzima envolvida em vários processos fisiológicos, como a reparação do ADN, diferenciação celular, transcrição genética, estabilidade genómica e morte celular. Por danificar o ADN, o peroxinitrito é considerado um impulsor fisiopatológico desta enzima, que é, então, hiperactivada e actua na patologia de duas maneiras: por um lado, promove a extensão da inflamação através de mecanismos pró-inflamatórios e, por outro lado, provoca a morte celular, ao retirar do sistema energia que é necessária à vida das células (Lohinai et al., 2003; Pacher & Szabo, 2008). Com efeito, para tentar reparar os danos causados no ADN, a PARP liga-se aos locais de ruptura da cadeia de nucleótidos e divide a  $\text{NAD}^+$  em nicotinamida e ADP-ribose, que depois é adicionada a proteínas nucleares, como a histona, e à própria PARP (Virág et al., 2003; Lohinai et al., 2003; Pacher & Szabo, 2008; Islam et al., 2016). Ou seja, a hiperactivação da PARP causa o consumo exagerado de  $\text{NAD}^+$  intercelular, o que inibe os processos de glicólise e transporte de electrões, daí que se considere que a reparação dos danos de ADN seja um mecanismo energeticamente exaustivo. Como é conhecido, a glicólise é um processo que representa uma grande fonte de energia para o organismo. Com a inibição da glicólise, a quantidade de adenosina trifosfato (ATP) é drasticamente reduzida e consequentemente, as células tornam-se disfuncionais e, posteriormente, necróticas. Quando existe apoptose, a célula programa a sua morte e esse processo dá-se de maneira controlada. Na necrose celular, que ocorre quando existe falta de ATP, as membranas celulares perdem a sua integridade e a célula fica incapacitada de remover os seus produtos indesejados, libertando-os descontroladamente, o que pode afectar as células vizinhas (Islam et al., 2016).

Diversos estudos mostraram que quando se bloqueia a PARP, reduz-se a morte celular consequente da falta de ATP. Para além disso, o bloqueio da PARP resulta numa menor concentração de células inflamatórias e numa menor extensão de células necróticas, por diminuição da resposta das células imunitárias. Isto significa uma redução da actividade da iNOS, o que se traduz numa produção de óxido nítrico diminuída e, consequentemente, numa diminuição do dano de ADN (Islam et al., 2016; Adachi et al., 2017). Os mesmos trabalhos permitiram concluir que, na presença de um inibidor da PARP, é verificado um decréscimo de perda óssea, diminuição de



macrófagos e ligeira queda da concentração de células gengivais com presença de nitrotirosina, sendo todos eles indicadores da periodontite. Desta maneira, com a inibição da PARP prevê-se uma melhoria na doença periodontal (Adachi et al., 2017).

Os níveis de PARP não são os únicos a ser utilizados para medir o dano oxidativo do ADN na doença periodontal. Também a 8-hidroxidesoxiguanosina (8-oxo-dG), que é considerada o melhor marcador de danos no ADN, apresenta níveis elevados em estudos que comparam indivíduos saudáveis com pacientes periodontais (Fentoğlu et al., 2015). A 8-oxo-dG é formada através da mutação do ADN por associação com hidroperóxidos, que têm origem na reacção entre peroxinitrito e proteínas nos núcleos celulares (Ahmad et al., 2009).

### **3.7. Reabsorção Óssea**

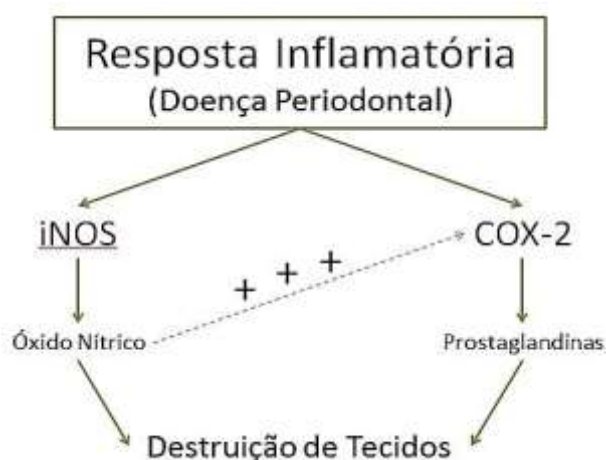
A reabsorção do osso alveolar, característica da periodontite, tem sido fortemente relacionada com a presença de iNOS e com a actividade do óxido nítrico. No entanto, tal opinião é controversa já que alguns estudos apontam para o facto de o óxido nítrico ser um potencial inibidor da reabsorção óssea, quando em grandes concentrações, enquanto que, em baixas concentrações, regula a actividade dos osteoclastos. A controvérsia deve-se também ao facto de se associar o óxido nítrico a uma regulação do ciclo de formação e destruição óssea mas, ao mesmo tempo, este ser estimulado pelas citocinas que estão associadas à reabsorção óssea (Ralston et al., 1995; van't Hof et al., 2000).

A IL-1 é uma citocina característica da doença periodontal conhecida por ser uma grande fonte de óxido nítrico e está bastante associada à perda óssea através da activação de uma cascata de eventos que culmina na activação de NFκB, um complexo proteico que desencadeia a diferenciação dos osteoclastos. Van't Hof et al. (2002) mostraram que, na ausência de IL-1, o óxido nítrico não tem capacidade de reabsorção óssea, mas que para existir reabsorção óssea induzida pela IL-1 é necessário que a iNOS não seja inibida, ou seja, é necessária a presença de óxido nítrico. Isto indica que o óxido nítrico produzido pela iNOS tem uma função moduladora na IL-1 quando se trata de perda óssea (van't Hof et al., 2000).

Ralston et al., (1995) estudaram a associação do óxido nítrico à reabsorção óssea e concluíram que, em grandes quantidades, este tem capacidade de inibir a actividade osteoclástica, mas que em quantidades moderadas e associado à IL-1 e à TNF, induz reabsorção óssea. Estudaram, ainda, que quando existe inibição da formação de óxido nítrico, a reabsorção óssea cessa. Tal como van't Hof et al., Ralston et al. provaram que para existir reabsorção óssea é necessária a co-presença de óxido nítrico e citocinas (Ralston et al., 1995).

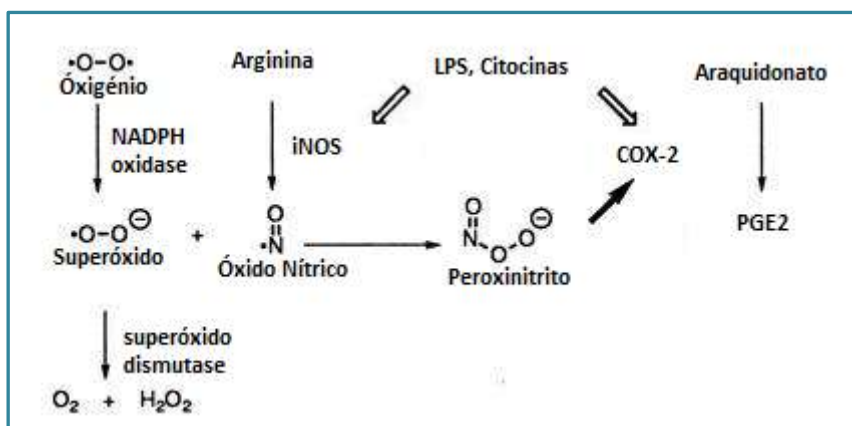
A ciclooxigenase-2 é uma enzima produzida em simultâneo com a iNOS pelas células inflamatórias. A PGE2 é uma substância peptídica sintetizada pela enzima COX-2 com participação na doença periodontal e fortemente relacionada com a reabsorção óssea, por promover a formação e diferenciação de células ósseas. O óxido nítrico não participa na expressão genética da COX-2, mas tem função regulatória na expressão enzimática desta através da indução da sua activação. Por esse motivo, considera-se que o óxido nítrico tem a capacidade de induzir a prostaglandina (Hughes et al., 1999; Needleman & Manning, 1999). O mecanismo pelo qual o óxido nítrico consegue activar a COX-2 está ainda pouco esclarecido mas foram propostas algumas hipóteses (Toriyabe, Omote, Kawamata & Namiki, 2004), nomeadamente:

- remoção de O<sub>2</sub> da enzima através da acção antioxidante do óxido nítrico. Na COX-2, o O<sub>2</sub> funciona como um autoinactivador;
- formação de nitrosotióis a partir da COX-2, o que modificaria a sua estrutura e poderia levar à sua activação;
- oxidação da COX-2 pelo peroxinitrito, que age como activador da enzima.



**Figura 13.** Estímulo da produção de prostaglandinas através da activação da COX-2 pelo NO (Traduzido e adaptado de Needleman & Manning, 1999).

O  $\text{ONOO}^-$  estimula a actividade peroxidase da COX-2 através da sua oxidação e, por isso, aumenta a produção de PGE2 (Landino, Crews, Timmons, Morrow & Marnett, 1996; Needleman & Manning, 1999).



**Figura 14.** O peroxinitrito é sintetizado através da reacção entre o óxido nítrico e o superóxido e activa a COX-2, que sintetiza PGE2 a partir do araquidonato (Traduzido e adaptado de Landino et al., 1996).

A PGE2 apresenta mecanismos de activação dependentes e independentes do óxido nítrico e a quantidade de PGE2 formada por este é reduzida comparativamente à quantidade formada por mecanismos independentes. Não obstante, o óxido nítrico continua a ser um precursor significativo de PGE2, daí justificar-se uma maior reabsorção óssea e concentração de prostaglandinas quando o mesmo está presente (Hughes et al., 1999).

Assim, conclui-se que o óxido nítrico estimula a reabsorção óssea através de:

- estimulação da IL-1 e consequente activação de NFκB , essencial na diferenciação de osteoblastos (van't Hof et al., 2000);
- estimulação da COX-2, o que resulta no aumento de prostaglandinas, com actividade na osteoclasia (Hughes et al., 1999; Needleman & Manning, 1999).

## **4. MEDIÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO**

---

### **4.1. Medição de produtos do NO**

Geralmente, utilizam-se as concentrações de nitrito nos fluidos biológicos (saliva, fluido gengival crevicular e sangue) para se prever quais as concentrações de óxido nítrico neles presentes, já que o primeiro é um produto mais estável da oxidação do último. Com efeito, o óxido nítrico tem um tempo de vida muito curto, reagindo rapidamente com o oxigénio para formar  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , dificultando a sua medição directa. O nitrato é demasiado estável para ser usado em métodos quantitativos baseados na sua reactividade com outras espécies. Por este motivo, o nitrito é, normalmente, o metabolito escolhido como biomarcador de óxido nítrico, sendo que o método analítico mais utilizado para fazer a sua medição é o método de Griess (Ellis, Adatia, Yazdanpanah & Makela, 1998; Topcu et al., 2014). Este método consiste na reacção, num meio ácido, entre nitrito e sulfanilamida e, posteriormente, N-1-naftiletilenodiamina, de modo a que se produza um corante. Caso também se queira quantificar o nitrato, este é previamente reduzido a nitrito através de redutases de nitrato para poder ser, depois, quantificado através da reacção de Griess. (Ellis et al., 1998)

Importa referir que nalguns estudos foi medida, simultaneamente, a concentração de nitrito e nitrato como marcador do óxido nítrico. Porém, os resultados obtidos mostraram que o nitrito pode ser um melhor indicador da actividade do óxido nítrico do que o nitrato, uma vez que as bactérias presentes na cavidade oral interagem muito mais com este último, podendo até existir depósito de nitrato proveniente dos alimentos nalgumas criptas linguais, não estando, por conseguinte, relacionado com a presença de óxido nítrico (Topcu et al., 2014).

Assim, a medição de óxido nítrico na saliva tem sido feita, essencialmente, através da medição de nitrito. São conhecidas duas fontes de nitrito no organismo, sendo uma a oxidação do óxido nítrico e a outra através da redução do nitrato inorgânico. O nitrato ingerido na alimentação é reduzido a nitrito na parte posterior da língua; tal facto, poderia levar a pensar que a quantidade de nitrito na saliva seria não só resultado da oxidação do óxido nítrico como também da redução do nitrato pelas redutases de nitrato. No entanto, num estudo realizado por Aurer et al. (2001), mediram-se as concentrações de  $\text{NO}_2^-$  em indivíduos antes e após submissão a dietas ricas em

$\text{NO}_3^-$  e verificou-se que a elevada ingestão de  $\text{NO}_3^-$  não interferiu na quantidade de  $\text{NO}_2^-$  salivar, pelo que se depreende que este nitrito seja proveniente apenas do óxido nítrico, constituindo um fiel marcador da quantidade local deste último (Aurer, Aleksic, Ivic-Kardum, Aurer & Culo, 2001).

Num estudo realizado por Parwani et. al, foi demonstrado que os níveis salivares de nitrito são maiores em pacientes com gengivite, comparativamente com indivíduos saudáveis, e maiores ainda em pacientes com periodontite, comparativamente com pacientes com gengivite ou indivíduos saudáveis. Estes resultados vão de encontro a estudos feitos anteriormente, onde se mostrou que os níveis de nitrito, enquanto reflexo da presença de óxido nítrico, são maiores quanto maior for a severidade da doença periodontal (Parwani, Chitnis & Parwani, 2012). Isto foi também comprovado noutro estudo, por Reher et al. (2007), em que se compararam os níveis salivares de nitrito de indivíduos saudáveis, com periodontite crónica moderada e com periodontite crónica severa, onde a perda de tecido periodontal atinge maior gravidade. Para além de ser maior a concentração de nitrito em sujeitos doentes, há uma diferença na concentração de nitrito entre várias formas da doença, sendo maior a quantidade de  $\text{NO}_2^-$  no caso da periodontite crónica severa (Reher, Zenóbio, Costa, Reher & Soares, 2007). No entanto, quantificar o nitrito presente apenas no fluido gengival crevicular poderia ser mais objectivo na apresentação de um possível diagnóstico, já que o fluido gengival crevicular é mais específico na doença periodontal do que a saliva, cuja composição pode ser alterada pela presença de outros factores como cáries ou doenças das glândulas salivares (Topcu et al., 2014).

Wadhwa et. al demonstraram que os níveis de nitrito presentes na saliva e no sangue são substancialmente maiores em pacientes fumadores com periodontite crónica do que em pacientes periodontopatológicos não-fumadores. Isto pode ser explicado pelo grande aumento do *stress* oxidativo causado pelo fumo dos cigarros, que ao aumentarem a quantidade de ROS conseguem exponenciar a actividade destas nos processos patológicos. Para além disso, os efeitos do tabaco afectam as respostas imunológicas e vasculares, importantes na doença periodontal (Wadhwa et al., 2013).

Importa sublinhar que, quando os níveis de nitrito são medidos no fluido crevicular gengival, os resultados não são concordantes com os encontrados na saliva e no sangue. Admitindo que os valores encontrados refletem os níveis de óxido nítrico presente no fluido crevicular gengival, estes são mais elevados quando existe gengivite e menores em indivíduos saudáveis ou com periodontite. Tal acontece porque na

presença de periodontite, é provável que o óxido nítrico esteja a ser consumido ao intervir no processo de defesa à inflamação inicial, uma vez que se tratam, neste estudo, de pacientes com periodontite numa fase não avançada e com bolsas de apenas 5 mm. Outra hipótese para as concentrações de nitrito no FCG serem menores na periodontite pode ser devido ao facto do óxido nítrico reagir com outros oxidantes presentes no processo inflamatório naquele local (Poorsattar Bejeh-Mir et al., 2014).

Após ser realizado o tratamento para a doença periodontal, os níveis de nitrito, comparativamente com os resultados pré-tratamento periodontal, encontram-se diminuídos. Mais uma vez, relaciona-se a quantidade de óxido nítrico com o grau de inflamação e destruição de tecidos, já que existe um decréscimo da actividade de óxido nítrico quando a inflamação diminui. Apesar disto, a presença de óxido nítrico em pacientes em fase de pós-tratamento gengival e periodontal continua a ser maior do que em indivíduos saudáveis (Parwani et al., 2012).

O aumento do sangramento quando se faz a sondagem de bolsas periodontais está relacionado com uma maior concentração de óxido nítrico na saliva. Tal facto reflecte a acção vasodilatadora do óxido nítrico, bem como a sua acção na inibição da agregação plaquetária. A vasodilatação também é responsável pela tumescência gengival que ocorre quando se inicia a doença periodontal, justificando o edema e vermelhidão da zona (Parwani et al., 2012).

No entanto, e apesar de em vários estudos se ter confirmado que as concentrações de óxido nítrico são maiores em pacientes com doença periodontal e nalguns até se afirmar que a concentração da molécula está relacionada com a severidade da doença, outros estudos demonstram precisamente o contrário, apresentando menores concentrações da molécula em doentes periodontais. Por exemplo, Aurer et al. (2001) estudou os níveis salivares de  $\text{NO}_2^-$  em indivíduos saudáveis, com periodontite crónica e com periodontite agressiva, em que a doença decorre de maneira mais rápida e violenta. Verificou-se que a concentração de  $\text{NO}_2^-$  tem valor diminuído em pacientes com periodontite agressiva comparativamente com os pacientes com periodontite crónica. Ainda assim, a maior diferença é relativamente aos indivíduos saudáveis deste estudo, que apresentam, em amostras retiradas dos canais das glândulas salivares que desembocam na cavidade oral, a maior concentração de nitrito. Isto pode estar relacionado com a interacção de proteínas salivares com o óxido nítrico, já que na doença periodontal é normal existirem grandes aglomerados de proteínas no meio salivar (Aurer et al., 2001).

**Tabela 1.** Características de estudos que comparam os níveis de NO na doença periodontal.

Autor	Amostra	Objectivo	Conclusão
Reher et al. (2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 indivíduos saudáveis</li> <li>• 10 com PC moderada</li> <li>• 10 com PC severa</li> </ul>	Comparar níveis de NO em saliva estimulada em pacientes com e sem DP e correlacionar os resultados com parâmetros clínicos.	Os níveis de NO são consideravelmente maiores em pacientes com PC do que em indivíduos saudáveis, e entre os dois grupos de indivíduos com doença periodontal, os que apresentam PC severa apresentam níveis de NO elevados relativamente ao grupo com PC moderada.
Parwani et al. (2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 indivíduos saudáveis;</li> <li>• 30 indivíduos com gengivite;</li> <li>• 30 indivíduos com periodontite</li> </ul>	Comparar níveis de NO em indivíduos saudáveis, com gengivite e com periodontite e re-avaliar estes níveis após tratamento periodontal.	Níveis de NO superiores em pacientes com gengivite e periodontite relativamente a indivíduos saudáveis. Estes níveis de NO decrescem após tratamento periodontal.
Sundar et al. (2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 indivíduos saudáveis</li> <li>• 20 indivíduos com PC</li> <li>• 20 indivíduos com PA</li> </ul>	Comparar níveis de NO salivares e sanguíneos em indivíduos saudáveis, com PC e com PA.	Níveis salivares e sanguíneos de NO superiores em pacientes com PC e PA do que em indivíduos saudáveis.
Poorsattar Bejeh-Mir et al. (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 14 indivíduos saudáveis</li> <li>• 14 pacientes com gengivite</li> <li>• 14 pacientes com periodontite</li> </ul>	Comparar níveis de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e NO salivares e no FGC em indivíduos saudáveis, com gengivite e com periodontite.	Níveis salivares de NO e seus metabolitos consideravelmente maiores em pacientes com periodontite, seguidos de pacientes com gengivite e com níveis menores em indivíduos saudáveis. No FGC, os níveis superiores foram encontrados nos indivíduos saudáveis.
Hussain et al. (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 indivíduos com GC</li> <li>• 9 indivíduos com PC</li> <li>• 9 indivíduos com PA</li> </ul>	Comparar níveis de NO em saliva e FGC de pacientes com GC, PC e PA.	Níveis de NO salivares substancialmente superiores em pacientes com PA comparando com pacientes com GC e PC. No FGC, a maior distância de resultados encontra-se nos pacientes com GC (que apresentam a menor quantidade) comparativamente aos pacientes com periodontite. Mesmo assim, PA apresenta níveis superiores a PC no FCG.

**Legenda de abreviaturas da Tabela 1.** PC = Periodontite Crónica; PA = Periodontite Agressiva; GC = Gengivite Crónica; FGC = Fluido Gengival Crevicular; NO = Óxido Nítrico.

Por se confirmar em vários estudos uma associação do óxido nítrico à doença periodontal, a avaliação da concentração desta molécula tem sido sugerida como um possível meio de diagnóstico da doença periodontal (Reher et. al, 2007).

#### **4.2. Medição de iNOS**

Para além da medição do óxido nítrico através da quantificação dos seus produtos, alguns estudos investigaram a presença da enzima iNOS em amostras de tecidos de locais infectados, recolhidos em indivíduos saudáveis e em pacientes com variadas formas de doença periodontal. Gaspirc et al. (2002) estudaram tecidos de indivíduos saudáveis e com doença periodontal em fase inicial e concluíram que, tal como noutros estudos, tecidos com infiltrados inflamatórios tem maior porção de iNOS relativamente a tecidos sãos, que geralmente apresentam pouca ou nenhuma concentração de iNOS. Neste estudo, observou-se também que a enzima se encontra principalmente em macrófagos e no epitélio gengival (Gaspirc, Masera & Skaleric, 2002).

Noutro trabalho, Hussain et al. (2016) estudaram tecidos inflamados de indivíduos saudáveis, com gengivite, com periodontite crónica e com periodontite agressiva. Tal como esperado, e de acordo com resultados anteriores, aponta-se para a existência de maior quantidade de iNOS em locais infectados, existindo uma distinção entre as várias formas da doença, sendo a periodontite agressiva aquela que apresenta a maior infiltração de células inflamatórias e, consequentemente, de iNOS. A presença da enzima é mais forte no tecido epitelial e no tecido conjuntivo e a sua quantidade está directamente relacionada com a concentração de óxido nítrico no local, visto que esta é a precursora do óxido nítrico em situações inflamatórias. Daí poder considerar-se que, se a enzima se encontra aumentada, e que se a sua concentração varia consoante o estado de inflamação dos tecidos (sendo maior quanto maior for o estado inflamatório), os níveis enzimáticos constituem um indicador da presença de óxido nítrico (Hussain, McKay, Gonzales-Marin & Allaker, 2016).



### III. CONCLUSÕES

A doença periodontal é uma das doenças mais incidentes nos dias de hoje e, oralmente, tem graves consequências a nível funcional e estético para o paciente. A perda das peças dentárias conduz à perda da função mastigatória e diminuição da função de fala, e influencia a auto-estima do paciente por interferir com a estética oral. Para além de repercussões a nível oral, a doença periodontal está fortemente relacionada com doenças sistémicas. Posto isto, destaca-se a importância em estudar-se esta patologia e entender-se melhor alguns dos seus mecanismos fisiopatológicos, de modo a que se possa agir contra a doença e reduzir o seu impacto negativo no organismo e, consequentemente, na qualidade de vida do indivíduo.

O óxido nítrico tem sido, nos últimos anos, associado não só à defesa do organismo, mas também à destruição dos tecidos na doença periodontal, pois foram reconhecidos mecanismos bioquímicos citotóxicos para o organismo. Daí se concluir que conhecer a sua acção precisa nos vários tecidos e nas várias fases englobados na doença periodontal é de extrema importância, o que poderia levar ao desenvolvimento de novas terapêuticas nas várias fases da doença. Refira-se, porém, que, apesar de se reconhecer que o óxido nítrico tem uma ampla influência na doença periodontal, ainda não estão claramente esclarecidos as razões e os mecanismos através dos quais este participa na mesma. Ou seja, a realização futura de estudos aprofundados sobre esta temática será de grande utilidade na compreensão do papel do óxido nítrico na doença periodontal.

Como a doença periodontal pode não desenvolver, inicialmente, características clinicamente detectáveis, uma identificação precoce da doença através de biomarcadores pode ditar uma progressão menos violenta desta, através de uma intervenção mais atempada. Assim, propõe-se que a medição dos níveis de óxido nítrico possa ser utilizada quando existe suspeita de doença ou até em indivíduos que reúnam características que façam deles susceptíveis. Note-se que, apesar de se ter demonstrado nalguns estudos que se pode deduzir a presença de óxido nítrico através da quantidade da enzima iNOS nos tecidos inflamados, retirar amostras de tecido periodontal de pacientes periodontais não parece ser uma opção viável.

Concluindo, é de tamanha importância estudar os intervenientes na doença periodontal – neste caso o óxido nítrico e os seus metabolitos derivados – de modo a

que seja possível identificar e, posteriormente, intervir numa doença que até hoje é recorrente em demasiados indivíduos.

#### IV. BIBLIOGRAFIA

- Adachi, K., Miyajima, S. I., Nakamura, N., Miyabe, M., Kobayashi, Y., Nishikawa, T., ... Naruse, K. (2017). Role of Poly(ADP - ribose) Polymerase Activation in the Pathogenesis of Periodontitis in Diabetes. *J Clin Periodontol*. Publicação electrónica antecipada. doi: 10.1111/jcpe.12758
- Ahmad, R., Rasheed, Z., & Ahsan, H. (2009). Biochemical and Cellular Toxicology of Peroxynitrite: Implications in Cell Death and Autoimmune Phenomenon. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31(3), 388–396. doi: 10.1080/08923970802709197
- Antonini, R., Cancellier, K., Ferreira, G. K., Scaini, G. & Streck, E. L. (2013). Fisiopatologia da Doença Periodontal. *Revista Inova Saúde*, 2(2), 90-107.
- Aurer, A., Aleksic, J., Ivic-Kardum, M., Aurer, J., & Culo, F. (2001). Nitric Oxide Synthesis is Decreased in Periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28, 565-568. doi: 10.1034/j.1600-051x.2001.028006565.x
- Barreto, R. L., Correia, C. R. D., & Muscará, M. N. (2005). Óxido Nítrico: Propriedades e Potenciais Usos Terapêuticos. *Química Nova*, 28(6), 1046-1054. doi: 10.1590/S0100-40422005000600020
- Borkar, S. P., Bhutada, G., & Pandagale, S. (2016). Nitric Oxide as an Inflammatory Biomarker in Oral and Periodontal Diseases. *Int J Oral Health Med Res*, 3(2), 76-80.
- Bryan, N. S., & Loscalzo, J. (2011). Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease. *Nutrition and Health*, 1, 3-7. doi: 10.1007/978-1-60761-616-0
- Çanarçi, C. F., & Doğan, G. E. (2014). Role of Nitric Oxide in Inflammatory Periodontal Diseases: A Review. *J Dent Fac Atatürk Uni*, 9, 74-84. doi: 10.17567/dfd.10482
- Cavalla, F., Hernández-Ríos, P., Sorsa, T., Biguetti, C., & Hernández, M. (2017). Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal

- Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 440. doi: 10.3390/ijms18020440
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and Immune Pathways in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Periodontol 2000*, 64(1), 57-80. doi: 10.1111/prd.12002
- Cerqueira, N. F. & Yoshida, W. B. (2002). Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cir Bras*, 17(6), 417-423. doi: 10.1590/S0102-86502002000600011
- Coleman, J. W. (2001). Nitric Oxide in Immunity and Inflammation. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1397-1406. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00086-8
- deBoer, T. R., Palomino, R. I., Idiga, S. O., Millhauser, G. L., & Mascharak, P. K. (2014). Tyrosine Nitration in Peptides by Peroxynitrite Generated in situ in a Light-controlled Platform: Effects of pH and Thiols. *J Inorg Biochem*, 138, 24-30. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.04.018
- Dusse, L. M. S., Vieira, L. M., & Carvalho, M. G. (2003). Revisão Sobre Óxido Nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, 39(4), 343-350. doi:10.1590/S1676-24442003000400012.
- Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M., & Makela, S. K. (1998). Nitrite and Nitrate Analyses: A Clinical Biochemistry Perspective. *Clinical Biochemistry*, 31(4), 195–220. doi: 10.1016/S0009-9120(98)00015-0
- Fentoğlu, Ö., Kırzioğlu, F.Y., Bulut, M. T., Kumbul Doğuç, D., Kulaç, E., Önder, C., & Günhan, M. (2015). Evaluation of Lipid Peroxidation and Oxidative DNA Damage in Patients With Periodontitis and Hyperlipidemia. *J Periodontol.*, 86(5), 682-8. doi: 10.1902/jop.2015.140561
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *European Heart Journal*, 33(7), 1–13. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
- Gaspirc, B., Masera, A., & Skaleric, U. (2002). Immunolocalization of Inducible Nitric Oxide Synthase in Localized Juvenile Periodontitis Patients. *Connective Tissue Research*, 43, 413–418. doi: 10.1080/03008200290000628

- Gupta, N., Gupta, N. D., Gupta, A., Khan, S., & Bansal, N. (2015). Role of Salivary Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8) in Chronic Periodontitis Diagnosis. *Front Med.*, 9(1), 72-6. doi: 10.1007/s11684-014-0347-x
- Guzik, T.J., Korbout, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation and Immune Regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(4), 469-487.
- Hall, E. D., Wang, J. A., Bosken, J. M., & Singh, I. N. (2016). Lipid Peroxidation in Brain or Spinal Cord Mitochondria After Injury. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(2), 169–174. doi: 10.1007/s10863-015-9600-5
- Harvey, J. D. (2017). Periodontal Microbiology. *Dent Clin North Am.*, 61(2), 253-269. doi: 10.1016/j.cden.2016.11.005.
- Hasturk, H., & Kantarci, A. (2015). Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontol 2000.*, 69(1), 255-73. doi: 10.1111/prd.12105.
- Herrera, B. S., Martins-Porto, R., Maia-Dantas, A., Campi, P., Spolidorio, L. C., Costa, S. K., ... Muscara, M. N. (2011). iNOS-derived Nitric Oxide Stimulates Osteoclast Activity and Alveolar Bone Loss in Ligature-induced Periodontitis in Rats. *J Periodontol.*, 82(11), 1608-15. doi: 10.1902/jop.2011.100768
- Hughes, F. J., Buttery, L. D. K., Mika, V. J., Hukkanen, M. V. J., O'Donnell, A., Maclof, J., & Polak, J. M. (1999). Cytokine-induced Prostaglandin E2 Synthesis and Cyclooxygenase-2 Activity Are Regulated Both by a Nitric Oxide-dependent and -independent Mechanism in Rat Osteoblasts in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1776-1782. doi: 10.1074/jbc.274.3.1776
- Hussain, Q. A., McKay, I. J., Gonzales-Marin, C., & Allaker, R. P. (2016). Detection of Adrenomedullin and Nitric Oxide in Different Forms of Periodontal Disease. *J Periodont Res*, 51, 16–25. doi:10.1111/jre.12273
- Islam, B. U., Habib, S., Ahmad, P., Allarakha, S., Moinuddin, & Ali, A. (2015). Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human

- Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP). *Indian J Clin Biochem*, 30(4), 368-85. doi: 10.1007/s12291-014-0475-8
- Islam, B. U., Habib, S., Ali, S. A., Moinuddin, & Ali, A. (2016). Role of Peroxynitrite-Induced Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in Circulatory Shock and Related Pathological Conditions. *Cardiovasc Toxicol*, 17(4), 373–383. doi: 10.1007/s12012-016-9394-7
- Kendall, H., Marshall, R., & Bartold, P. (2001). Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases*, 7, 2-10. doi: 10.1034/j.1601-0825.2001.70102.x
- Kim, J. J., Kim, C. J., & Camargo, P. M. (2013). Salivary Biomarkers in The Diagnosis of Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc.*, 41(2), 119-24.
- Kim-Shapiro, D. B., & Gladwin, M. T. (2014). Mechanisms of Nitrite Bioactivation. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*, 0, 58-68. doi:10.1016/j.niox.2013.11.002
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G. & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal Diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 3(1703). doi: 10.1038/nrdp.2017.38
- Landino, L. M., Crews, B., C., Timmons, M., D., Morrow, J., D., & Marnett, L., J. (1996). Peroxynitrite, The Coupling Product of Nitric Oxide and Superoxide, Activates Prostaglandin Biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(26), 15069–15074.
- Larsen, T., & Fiehn, N. E. (2017). Dental Biofilm Infections – an Update. *APMIS*, 125(4), 376-384. doi: 10.1111/apm.12688
- Lindhe, J., Karring, T., & Araújo, M. (2003). Anatomy of the Periodontium. In J. Lindhe, T. Karring e N. P. Lang. (Eds.) *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Oxford: Blackwell.
- Lohinai, Z., Mabley, J. G., Fehér, E., Marton, A., Komjáti, K. & Szabó, C. (2003). Role of The Activation of The Enzyme Poly(ADP-Ribose) Polymerase in The Pathogenesis of Periodontitis. *J Dent Res*, 82(12), 987-92. doi: 10.1177/154405910308201210

- Lohinail, Z., Stachlewitz, R., Virag, L., Székely, A. D., Hask, G., & Szabo, C. (2001). Evidence for Reactive Nitrogen Species Formation in the Gingivomucosal Tissue. *Journal of Dental Research*, 80(2), 470-475. doi: 10.1177/00220345010800021401
- Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J. C., Cottin, Y., Vergely, C., & Rochette, L. (2013). Arginine and Nitric Oxide Synthase: Regulatory Mechanisms and Cardiovascular Aspects. *Mol Nutr Food Res*, 58(1), 101-16. doi: 10.1002/mnfr.201300033.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Ahluwalia, A., Benjamin, N., Bryan, N. S., Butler, A., & Weitzberg, E. (2009). Nitrate and Nitrite in Biology, Nutrition and Therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 5(12), 865–869. doi: 10.1038/nchembio.260
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The Nitrate–nitrite–nitric Oxide Pathway in Physiology and Therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 156-167. doi:10.1038/nrd2466
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular Aspects of The Pathogenesis of Periodontitis. *Periodontology 2000*, 69, 7–17. doi: 10.1111/prd.12104
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease. *Periodontology 2000*, 40, 11-28. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x
- Nedzi-Góra, M., Kowalski, J., & Górski, R. (2017). The Immune Response in Periodontal Tissues. *Arch Immunol Ther Exp*. Publicação electrónica antecipada. doi: 10.1007/s00005-017-0472-8
- Needleman, P., & Manning, P. T. (1999). Interactions Between the Inducible Cyclooxygenase (COX-2) and Nitric Oxide Synthase (iNOS) Pathways: Implications for Therapeutic Intervention in Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7, 367–370. doi: 10.1053/joca.1998.0237

- Nyman, S., & Lindhe, J. (2003). Examination of Patients with Periodontal Disease. In J. Lindhe, T. Karring e N. P. Lang. (Eds.) *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Oxford: Blackwell.
- Pacher, P., & Szabo, C. (2008). Role of the Peroxynitrite-Poly(ADP-Ribose) Polymerase Pathway in Human Disease. *The American Journal of Pathology*, 173(1), 2–13. doi: 10.2353/ajpath.2008.080019
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006
- Parwani, S. R., Chitnis, P. J., & Parwani, R.N. (2012). Salivary Nitric Oxide Levels in Inflammatory Periodontal Disease – A Case-control and Interventional Study. *Int J Dent Hygiene*, 10, 67–73. doi: 10.1111/j.1601-5037.2011.00508.x
- Poorsattar Bejeh-Mir, A., Parsian, H., Akbari Khoram, M., Ghasemi, N., Bijani, A., & Khosravi-Samani, M. (2014). Diagnostic Role of Salivary and GCF Nitrite, Nitrate and Nitric Oxide to Distinguish Healthy Periodontium from Gingivitis and Periodontitis. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(3), 138–145.
- Qu, X. M., Wu, Z. F., Pang, B. X., Jin, L. Y., Qin, L. Z., & Wang, S. L. (2016). From Nitrate to Nitric Oxide: The Role of Salivary Glands and Oral Bacteria. *J Dent Res.*, 95(13), 1452-1456. doi: 10.1177/0022034516673019
- Ralston, S. H., Ho, L. P., Helfrich, M. H., Grabowski, P. S., Johnston, P. W., & Benjamin, N. (1995). Nitric Oxide: A Cytokine-induced Regulator of Bone Resorption. *J Bone Miner Res.*, 10(7), 1040-9. doi: 10.1002/jbmr.5650100708
- Reher, V. G., Zenóbio, E. G., Costa, F.O., Reher, P., & Soares, R.V. (2007). Nitric Oxide Levels in Saliva Increase With Severity of Chronic Periodontitis. *J Oral Sci*, 49(4), 271-6.
- Sapna, G., Gokul, S., & Bagri-Manjrekar, K. (2014). Matrix Metalloproteinases and Periodontal Diseases. *Oral Dis*, 20, 538–550. doi: 10.1111/odi.12159



- Shaker, O., Ghallab, N. A., Hamdy, E., & Sayed, S. (2013). Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Gingival Tissues of Chronic Periodontitis With and Without Diabetes: Immunohistochemistry and RT-PCR Study. *Arch Oral Biol.*, 58(10), 1397-406. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.05.003
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., ... Gamonal, J. (2015). Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases. *J Appl Oral Sci*, 23(3), 329-55. doi: 10.1590/1678-775720140259
- Sundar, N. M., Krishnan, V., Krishnaraj, S., Hemalatha, V. T., & Alam, M. N. (2013). Comparison of The Salivary and The Serum Nitric Oxide Levels in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Biochemical Study. *J Clin Diagn Res.*, 7(6), 1223-7. doi: 10.7860/JCDR/2013/5386.3068
- Topcu, A.O., Akalin, F.A., Sahbazoglu, K.B., Yamalik, N., Kilinc, K., Karabulut, E., & Tözüm, T.F. (2014). Nitrite and Nitrate Levels of Gingival Crevicular Fluid and Saliva in Subjects with Gingivitis and Chronic Periodontitis. *J Oral Maxillofac Res*, 5(2). doi: 10.5037/jomr.2014.5205
- Toriyabe, M., Omote, K., Kawamata, T., & Namiki, A. (2004). Contribution of Interaction between Nitric Oxide and Cyclooxygenases to the Production of Prostaglandins in Carrageenan-induced Inflammation. *Anesthesiology*, 101, 983–90. doi: 10.1097/00000542-200410000-00025
- van't Hof, R. J., Armour, K. J., Smith, L. M., Armour, K. E., Wei, X. Q., Liew, F. Y., & Ralston, S. H. (2000). Requirement of the Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway for IL-1-induced Osteoclastic Bone Resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(14), 7993-8. doi: 10.1073/pnas.130511497
- Virág, L., Szabó, E., Gergely, P., & Szabó, C. (2003). Peroxynitrite-induced Cytotoxicity: Mechanism and Opportunities For Intervention. *Toxicol Lett.* 140-141, 113-24. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00508-8
- Wadhwa, D., Bey, A., Hasija, M., Moin, S., Kumar, A., Aman, S., & Sharma, V. K. (2013). Determination of Levels of Nitric Oxide in Smoker and Nonsmoker Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 43(5), 215–220. doi: 10.5051/jpis.2013.43.5.215

Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. S. (2015). Vascular Nitric Oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2), 83-94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002